



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0820775-5 B1**



**(22) Data do Depósito:** 12/12/2008

**(45) Data de Concessão:** 20/04/2021

**(54) Título:** BACTÉRIA GENETICAMENTE MODIFICADA, BEM COMO MÉTODOS PARA A FABRICAÇÃO DE ÁCIDOS ÔMEGA-AMINOCARBOXÍLICOS, ÉSTERES DE ÁCIDO ÔMEGA-AMINOCARBOXÍLICO, LACTAMAS DERIVADAS DE ÁCIDOS ÔMEGA-AMINOCARBOXÍLICOS, E POLIAMIDAS

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/09; C08G 69/14; C08G 69/08.

**(30) Prioridade Unionista:** 17/12/2007 DE 10 2007 060 705.0.

**(73) Titular(es):** EVONIK OPERATIONS GMBH.

**(72) Inventor(es):** ANDREAS KARAU; VOLKER SIEBER; THOMAS HAAS; HARALD HÄGER; KATRIN GRAMMANN; BRUNO BÜHLER; LARS BLANK; ANDREAS SCHMID; GUIDO JACH; BERN LALLA; ANDREAS MÜLLER; KATRIN SCHULLEHNER; PETER WELTERS; THORSTEN EGGERT; ANDREA WECKBECKER.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2008067447 de 12/12/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/077461 de 25/06/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 17/06/2010

**(57) Resumo:** ÁCIDOS ÔMEGA-AMINOCARBOXÍLICOS, ÉSTER DE ÁCIDO ÔMEGA-AMINOCARBOXÍLICO OU LACTAMA DERIVADA DE ÁCIDOS ÔMEGA-AMINOCARBOXÍLICOS, MICRO-ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS EM RELAÇÃO AO SEU TIPO SELVAGEM QUE OS PRODUZEM, PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DOS DITOS MICRO-ORGANISMOS, PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DOS DITOS ÁCIDOS, LAURINLACTAMA, POLIAMIDA E PROCESSO PARA A FABRICAÇÃO DA MESMA A BASE DE LACTAMAS. A presente invenção refere-se a uma célula, que havia sido geneticamente modificada em relação ao seu tipo selvagem de forma que ela pode fabricar mais ácidos (Ômega)-aminocarboxílicos, mais ésteres de ácido (Ômega)-aminocarboxílico ou mais lactamas derivadas de ácidos (Ômega)-aminocarboxílicos a partir de ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico. Além disso, a presente invenção refere-se a um método para a fabricação de uma célula geneticamente modificada, às células que podem ser obtidas através desse método, a um método para a fabricação de ácidos (Ômega)-aminocarboxílicos, de ésteres de ácido (Ômega)-aminocarboxílico ou lactamas derivadas de ácidos (Ômega)-aminocarboxílicos, a ácidos (Ômega)-aminocarboxílicos que podem ser obtidos por esse método, ésteres de ácido (Ômega)-aminocarboxílicos ou lactamas derivadas de ácidos (Ômega)-aminocarboxílicos, a um método para a fabricação de poliamidas a base de ácidos (Ômega)-aminocarboxílicos ou a base de (...).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"BACTÉRIA GENETICAMENTE MODIFICADA, BEM COMO  
MÉTODOS PARA A FABRICAÇÃO DE ÁCIDOS OMEGA-  
AMINOCARBOXÍLICOS, ÉSTERES DE ÁCIDO OMEGA-  
AMINOCARBOXÍLICO, LACTAMAS DERIVADAS DE ÁCIDOS  
OMEGA-AMINOCARBOXÍLICOS, E POLIAMIDAS".**

[0001] A presente invenção se refere a células alteradas pela engenharia genética em relação ao seu tipo selvagem, a um método para a fabricação de uma célula alterada pela engenharia genética, às células que são obtidas através desse método, a um método para a fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, a um método para a fabricação de poliamidas a base de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos ou a base de lactamas assim como às poliamidas que podem ser obtidas através desse método.

[0002] Poliamidas são polímeros, cujas unidades de repetição (monômeros) possuem como característica os grupo amida. A designação "poliamida" é empregada normalmente como designação de materiais termoplásticos tecnicamente aplicáveis, sintéticos e delimita essa classe de material pelas proteínas quimicamente empregadas. Quase todas as poliamidas importantes derivam de aminas primárias, ou seja, em suas unidades de repetição aparece o grupo funcional  $-\text{CO}-\text{NH}-$ . Além disso, existem também as poliamidas de aminas secundárias ( $-\text{CO}-\text{NR}-$ , R = radical orgânico). Como monômeros para as poliamidas são especialmente empregados ácidos aminocarboxílicos, lactamas e/ou diaminas e ácidos dicarboxílicos.

[0003] É de especial importância a fabricação de poliamidas a base de lactamas. Assim, através da polimerização por abertura de anel de  $\epsilon$ -caprolactama, é obtido o produto empregado muitas vezes tecnicamente "poliamida 6", enquanto que através da polimerização

por abertura de anel de laurinelactama, é obtida a “poliamida 12” igualmente tecnicamente importante. Também copolímeros de lactamas, como copolímeros de  $\epsilon$ -caprolactama e laurinelactama (“poliamida 6/12”) são de grande importância técnica.

[0004] A fabricação de  $\epsilon$ -caprolactama é normalmente feita pela reação de ciclo-hexanona com o sulfato de hidrogênio ou com hidrocloreto das hidroxilaminas sob formação de ciclo-hexanonoxima. Esta é transformada em  $\epsilon$ -Caprolactama mediante a transposição de Beckmann, sendo muitas vezes utilizado ácido sulfúrico concentrado como catalisador. A fabricação da ciclo-hexanona é normalmente feita por oxidação catalítica de ciclo-hexano com oxigênio atmosférico, sendo que o ciclo-hexano é obtido por sua vez por hidratação de benzol.

[0005] Especialmente dispendiosa é a fabricação de laurinelactama. Esta é feita em escala industrial pelo fato de ser trimerizado primeiramente butadieno sob formação de ciclododecatrieno. O ciclododecatrieno é hidratado em seguida sob formação de ciclododecano e o ciclododecano assim formado é oxidado sob formação de ciclododecanona. O ciclododecanona assim formado é então reagido com hidroxilamina formando ciclododecanoxima, que é transformada em uma transposição de Beckmann em laurinelactama.

[0006] A desvantagem deste método conhecido do estado da técnica para a fabricação de lactamas por meio de transposição de Beckmann de oximas reside no fato de, entre outras coisas, como produto secundário serem formadas grandes quantidades de sais tais como por exemplo sulfato de sódio, que precisam ser eliminados. No estado da técnica, por essa razão, também são descritos outros métodos para a fabricação de lactamas, que não apresentam essas desvantagens. Assim sendo, o documento de patente EP-A-0 748 797 descreve um método para a fabricação de lactamas a partir de

dinitrilos, no qual o dinitrilo é hidratado formando o aminonitrilo mediante hidrólise ciclizante formando lactama. Como catalisador para a hidrólise ciclizante são descritos peneiras moleculares, tais como zeólita ácida, silicato e peneiras moleculares não zeolíticas, fosfato metálico e óxido metálico ou óxido misto metálico. Esse método porém, apresenta entre outras coisas, a desvantagem de a seletividade da reação da aminonitrila ser mínima através da hidrólise ciclizante e, por essa razão, serem formadas grandes quantidades de produtos secundários. Além disso, no caso dos métodos descritos a partir desse estado da técnica para a fabricação de lactamas são utilizados hidrocarbonetos tais como benzol ou butadieno, que são obtidos pelo processo de craqueamento de benzina ou petróleo e portanto resultam de matérias primas não renováveis. A fabricação de poliamidas, que se baseiam em lactamas fabricadas desse modo, deve ser portanto considerada desvantajosa do ponto de vista ecológico.

[0007] É tarefa da presente invenção, superar as desvantagens decorrentes do estado da técnica.

[0008] É especialmente tarefa da presente invenção apresentar um método através do qual podem ser formadas lactamas, especialmente laurilactama, em menos etapas de processo possíveis e sob formação de menos produtos secundários possíveis.

[0009] Além disso, é tarefa da presente invenção apresentar um método através do qual possa ser fabricada lactama, especialmente laurilactama a partir de matérias primas renováveis.

[00010] Uma contribuição para a solução da tarefas acima referidas é prestada por uma célula, que havia sido modificada em relação ao seu tipo selvagem pela engenharia genética, em que ela pode fabricar, em relação ao seu tipo selvagem, mais ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou mais lactamas derivadas de

ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos a partir de ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico. Uma célula desse tipo pode ser utilizada, para fabricar ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou porém a partir de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos por via fermentativa a partir de ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico, por exemplo a partir de ácido láurico.

[00011] A formulação “em que ela pode fabricar, em relação ao seu tipo selvagem, mais ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou mais lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos a partir de ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico” se refere ao caso de o tipo selvagem das células geneticamente modificadas não poder formar sobretudo ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ou pelo menos nenhuma quantidade representativa dessas composições e somente após modificação pela engenharia genética poderem ser formadas quantidades representativas desses componentes.

[00012] Entende-se por “tipo selvagem” de uma célula, preferivelmente uma célula cujo genoma está presente em um estado tal como ela surgiu naturalmente pela evolução. O termo é empregado tanto para toda a célula como também para genes individuais. O termo “tipo selvagem” porém não inclui aquelas células ou aqueles genes, cujas sequências gênicas haviam sido modificadas pelo menos parcialmente através do homem por meio de métodos recombinantes.

[00013] Neste caso, de acordo com a invenção, é preferido que a célula geneticamente modificada seja modificada pela engenharia genética de forma que em um intervalo de tempo definido, preferivelmente dentro de 2 horas, ainda mais preferivelmente dentro de 8 horas e o mais preferivelmente dentro de 24 horas, ela possa formar pelo menos 2 vezes, especialmente preferivelmente pelo

menos 10 vezes, além disso preferivelmente pelo menos 100 vezes, além disso ainda mais preferivelmente pelo menos 1.000 vezes e o mais preferivelmente pelo menos 10.000 vezes mais ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou lactama derivada de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos do que o tipo selvagem da célula. O aumento da formação de produto neste caso pode ser determinado por exemplo pelo fato de a célula, de acordo com a invenção e a célula do tipo selvagem separadas respectivamente sob as mesmas condições (mesma densidade celular, mesmo meio nutritivo, mesmas condições de cultura) serem cultivadas por um determinado intervalo de tempo em um meio nutritivo adequado e em seguida de a quantidade de produto-alvo (ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou lactama derivada de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos) ser determinada no meio nutritivo.

[00014] As células, de acordo com a invenção, podem ser procarióticas ou eucarióticas. Neste caso, pode se tratar de células de mamífero (como células humanas), de células vegetais ou de micro-organismos tais como leveduras, fungos ou bactérias, em que são especialmente preferidos micro-organismos e os mais preferidos bactérias e leveduras. Como bactérias, leveduras ou fungos são adequados especialmente aquelas bactérias, leveduras ou fungos que são depositados pela Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemanha, como cepas de bactérias, de levedura ou de fungo. Bactérias adequadas de acordo com a invenção pertencem aos gêneros, abaixo relacionados em <http://www.dsmz.de/species/bacteria.htm>, e leveduras adequadas de acordo com a invenção pertencem àqueles gêneros, abaixo relacionados em <http://www.dsmz.de/species/yeasts.htm> e fungos adequados de acordo com a invenção são aqueles que estão abaixo relacionados em <http://www.dsmz.de/species/fungi.htm>.

[00015] Células especialmente preferidas de acordo com a invenção derivam de células dos gêneros especialmente preferíveis *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Escherichia*, *Zymomonas*, *Yarrowia*, *Methylobacterium*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Clostridium*, em que *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* e *Pseudomonas putida* e o mais preferivelmente de *Escherichia coli*.

[00016] De acordo com uma forma de concretização preferida da célula de acordo com a invenção, esta apresenta em comparação com seu tipo selvagem uma atividade aumentada de pelo menos uma das enzimas a seguir:

[00017] i) de uma enzima EI, que catalisa a reação de ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico formando os ácidos  $\omega$ -hidroxicarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -hidroxicarboxílico correspondentes;

[00018] ii) de uma enzima EII, que catalisa a reação de ácidos  $\omega$ -hidroxicarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -hidroxicarboxílico formando os ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -oxocarboxílico correspondentes;

[00019] de uma enzima EIII, que catalisa a reação de ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -oxocarboxílicos formando os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos.

[00020] O termo “atividade aumentada de uma enzima”, conforme ele é utilizado acima em conexão com a enzima EI e nas concretizações a seguir em conexão com a enzima EII etc, deve ser entendido preferivelmente como atividade intracelular aumentada.

[00021] As concretizações a seguir e relação ao aumento da atividade enzimática em células aplicam-se tanto para o aumento da atividade da enzima EI como também para as enzimas a seguir

citadas, cuja atividade pode ser opcionalmente aumentada.

[00022] A princípio pode ser obtido um aumento da atividade enzimática pelo fato de se aumentar o número de cópias da sequência gênica ou das sequências gênicas, que codificam para a enzima, empregam um promotor forte ou utilizam um gene ou alelo, que codifica uma enzima correspondente com uma atividade aumentada e combina opcionalmente essas medidas. Células modificadas geneticamente de acordo com a invenção, são geradas por exemplo por transformação, transdução, conjugação ou por uma combinação desses métodos com um vetor, que contém o gene desejado, um alelo desse gene ou partes dele e um vetor que possibilita a expressão do gene. A expressão heteróloga é especialmente obtida através da integração do gene ou dos alelos no cromossomo da célula ou em um vetor replicante extracromossômico.

[00023] O documento de patente DE-A-100 31 999 dá uma visão geral sobre as possibilidades de aumentar a atividade enzimática em células no exemplo da piruvato-carboxilase, que é aqui relacionado a título de referência e cuja descrição com relação às possibilidades de aumento da atividade enzimática em células é parte integrante da descrição da presente invenção.

[00024] A expressão das enzimas ou genes acima citados e de todos abaixo relacionados pode ser demonstrada com auxílio de separação de proteína por gel monodimensional e bidimensional e mediante identificação visual subsequente da concentração de proteína com software de análise correspondente no gel. Se o aumento de uma atividade enzimática se basear exclusivamente em um aumento da expressão do gene correspondente, então a quantificação do aumento da atividade enzimática poderá ser determinada facilmente através de uma comparação das separações de proteína mono- ou bidimensionais entre tipo selvagem e célula

geneticamente modificada. Um método útil para a preparação dos géis de proteína no caso de bactérias corineformes e para a identificação das proteínas é o procedimento descrito por Hermann et al. (Electrophoresis, 22: 1712-23 (2001)). A concentração de proteína também pode ser analisada pela hibridização Western-Blot com um anticorpo específico para a proteína a ser demonstrada (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989) e em seguida análise visual com software correspondente para a determinação de concentração (Lohaus e Meyer (1989) Biospektrum, 5: 32-39; Lottspeich (1999), Angewandte Chemie 111: 2630-2647). A atividade de proteínas de ligação ao DNA pode ser medida por meio de do DNA-Band-Shift-Assays (também chamado de retardação em gel) (Wilson et al. (2001) Journal of Bacteriology, 183: 2151-2155). A ação de proteínas de ligação ao DNA sobre a expressão de outros genes pode ser comprovada através de diferentes métodos bem descritos do Reporter-gen-Assays (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989). As atividades enzimáticas intracelulares podem ser determinadas de acordo com vários métodos descritos (Donahue et al. (2000) Journal of Bacteriology 182 (19): 5624-5627; Ray et al. (2000) Journal of Bacteriology 182 (8): 2277-2284; Freedberg et al. (1973) Journal of Bacteriology 115 (3): 816-823). Na medida em que nas concretizações a seguir não estiverem indicados métodos concretos para a determinação da atividade de uma determinada enzima, a determinação do aumento da atividade enzimática e também a determinação da diminuição de uma atividade enzimática são feitas preferivelmente por meio dos métodos descritos em Hermann et al., Electrophoresis, 22: 1712-23 (2001), Lohaus et al., Biospektrum 5 32-39 (1998), Lottspeich, Angewandte

Chemie 111: 2630-2647 (1999) e Wilson et al., Journal of Bacteriology 183: 2151-2155 (2001).

[00025] Se o aumento da atividade enzimática for realizado por mutação do gene endogênico, então mutações desse tipo serão geradas de forma não direcionada de acordo com métodos clássicos, como por exemplo, através de radiação UV ou através de produtos químicos geradores de mutação, ou seletivamente por meio de métodos de engenharia genética tais como deleção(ões), inserção(ões) e/ou troca(s) de nucleotídeo. Através dessas mutações são obtidas mutações células geneticamente modificadas. Mutações de enzimas especialmente preferidas são especialmente também aquelas enzimas que não podem mais ser inibidas por feedback ou pelo menos em comparação com a enzima do tipo selvagem menos inibível por feedback.

[00026] Se o aumento da atividade enzimática se der mediante aumento da expressão de uma enzima, então será aumentado por exemplo o número de cópias dos genes correspondentes ou mutada a região do promotor e de regulação ou do local de ligação ao ribossomo, que se encontra a montante do gene estrutural. Do mesmo modo agem cassetes de expressão, que são embutidos a montante do gene estrutural. Através de promotores induzíveis é também possível, aumentar a expressão em qualquer momento. Além disso, podem ser atribuídas ao gene enzimático sequências regulatórias, mas também os assim chamados potenciadores ("Enhancer"), que produzem uma expressão gênica aumentada através de uma interação melhorada entre RNA-polimerase e DNA. Através de medida para prolongar a vida útil do m-RNA, também é melhorada a expressão. Além disso, mediante diminuição da decomposição da proteína enzimática também é reforçada a atividade enzimática. Os genes ou construtos gênicos, neste caso, estão presentes ou com diferente número de cópias ou

estão integrados e amplificados no cromossomo. Alternativamente, também pode ser obtida uma super expressão dos genes envolvidos mediante uso da composição do meio de cultura e controle de cultura. Instruções a esse respeito o versado na técnica poderá encontrar entre outros em Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), em Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya e Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), em Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), no documento de patente EP-A-0 472 869, no documento US 4,601,893, em Schwarzer e Puhler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), em Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), em LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), no documento de patente WO-A-96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in JP-A-10-229891, em Jensen e Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) e em livros didáticos conhecidos sobre genética e biologia molecular. As medidas acima descritas produzem, tal como as mutações, células geneticamente modificadas.

[00027] Para aumentar a expressão dos respectivos genes são utilizados por exemplo, plasmídeos episomais. Como plasmídeos são indicados aqueles que são replicados em bactérias corineformes. Inúmeros vetores plasmídicos conhecidos, como por exemplo pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology 64: 549-554 (1989)), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 107: 69-74 (1991)) ou pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) se referem aos plasmídeos cripticos pHM1519, pBL1 ou pGA1. Outros vetores plasmídicos, como por exemplo aqueles que se referem a pCG4 (US 4,489,160) ou pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66: 119-124 (1990)) ou pAG1 (US 5,158,891), podem ser igualmente utilizados.

[00028] Além disso, também são indicados aqueles vetores

plasmídicos, com a ajuda dos quais é possível empregar o método da amplificação gênica mediante integração no cromossomo, tal como por exemplo foi descrito por Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60: 126-132 (1994)) para a duplicação ou amplificação do operon *hom-thrB*. No caso desse método, o gene completo é clonado em um vetor plasmídico, que pode ser replicado em um hospedeiro (tipicamente *Escherichia coli*), mas não em *Corynebacterium glutamicum*. Como vetores podem ser empregados por exemplo pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1: 784-791 (1983)), pK18mob ou pK19mob (Schäfer et al., Gene 145: 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman, Journal of Biological Chemistry 269: 32678-84 (1994)), pCR®Blunt (Invitrogen, Groningen, Niederlande), pEM1 (Schrumpf et al., Journal of Bacteriology 173: 4510-4516)) ou pBGS8 (Spratt et al., Gene 41: 337-342 (1986)). O vetor plasmídico, que contém o gene a ser amplificado, é em seguida transportado para a cepa de *Corynebacterium glutamicum* desejada através de conjugação ou transformação. O método da conjugação é descrito, por exemplo, em Schäfer et al., Applied and Environmental Microbiology 60: 756-759 (1994). Métodos para a transformação são por exemplo descritos em Thierbach et al., Applied Microbiology and Biotechnology 29: 356-362 (1988), Dunican e Shivnan, Bio/Technology 7: 1067-1070 (1989) e Tauch et al., FEMS Microbiology Letters 123: 343-347 (1994). Após a recombinação homóloga por meio de um evento de cruzamento ("cross-over") a cepa resultante contém pelo menos duas cópias do gene em questão.

[00029] Entende-se pela formulação empregada acima e nas concretizações a seguir "uma atividade aumentada de um enzima Ex em relação ao seu tipo selvagem" sempre como uma atividade aumentada da respectiva enzima preferivelmente em um fator de pelo

menos 2, especialmente preferivelmente de pelo menos 10, além disso preferivelmente de pelo menos 100, além disso ainda mais preferivelmente de pelo menos 1.000 e o mais preferivelmente de pelo menos 10.000. Além disso, a célula de acordo com a invenção, que apresenta “uma atividade aumentada de uma enzima Ex em relação ao seu tipo selvagem”, compreende principalmente uma célula cujo tipo selvagem não apresenta atividade dessa enzima Ex ou não apresenta uma atividade comprovável dessa enzima Ex e que mostra uma atividade comprovável dessa enzima Ex somente após o aumento da atividade enzimática, por exemplo através da super expressão. Neste contexto, o termo “super expressão” ou a formulação empregada nas concretizações seguintes “aumento da expressão” também abrange o caso em que uma célula de partida, por exemplo uma célula do tipo selvagem, não apresenta expressão ou pelo menos não apresenta expressão comprovável e é induzida uma expressão da enzima Ex comprovável somente por métodos recombinantes.

[00030] Além disso, é preferido de acordo com a invenção, que a célula apresente uma atividade aumentada das enzimas EI e EII, das enzimas EI e EIII, das enzimas EII e EIII ou porém uma atividade aumentada de todas as enzimas EI, EII e EIII.

[00031] Além disso, é preferido em conexão com a forma de concretização preferida, acima descrita, da célula de acordo com a invenção, que como enzima EI seja uma alcanomono-oxigenase ou uma xilolmono-oxigenase, ou, preferivelmente e como enzima EII seja uma alcanomono-oxigenase, uma alcooldesidrogenase ou uma alcooloxidase, ou , preferivelmente e como enzima EIII seja uma  $\omega$ -transaminase.

[00032] Uma enzima preferida E1, especialmente uma alcanomono-oxigenase preferida é a alcanomono-oxigenase codificada pelo gene alkBGT a partir da *Pseudomonas putida* GPO1. O isolamento da

sequência gênica alkBGT é por exemplo descrito por van Beilen et al. in “Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria“, Journal of Bacteriology, Vol. 184 (6), Seiten 1.733-1.742 (2002). Além disso, como alcanomono-oxigenases também são utilizadas citocromo-P450-mono-oxigenases, especialmente citocromo-P450-mono-oxigenases a partir de *Candida*, por exemplo a partir de *Candida tropicalis*, ou a partir de plantas, por exemplo a partir do grão de bico (*Cicer arietinum* L.). As sequências gênicas de citocromo-P450-mono-oxigenases adequadas a partir de *Candida tropicalis* são apresentadas por exemplo no documento de patente WO-A-00/20566, enquanto as sequências gênicas de citocromo-P450-mono-oxigenases adequadas a partir de grão de bico podem ser consultadas por exemplo em Barz et al. in “Cloning and characterization of eight cytochrome P450 cDNAs from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures“, Plant Science, Vol. 155, páginas 101-108 (2000). Outros genes homólogos do gene alkB podem ser consultados também em van Beilen et al. in “Oil & Gas Science and Technology“, Vol. 58 (4), Seiten 427-440 (2003). Um gene adequado para uma xilomono-oxigenase é por exemplo o gene xylM ou o gene xylA, em que um plasmídeo contendo esses dois genes possui o N° de acesso do banco de genes M37480.

[00033] Uma enzima preferida EII, especialmente uma alcooldesidrogenase é, por exemplo, a alcooldesidrogenase codificada pelo gene alkJ (EC 1.1.99-2), principalmente a alcooldesidrogenase codificada pelo gene alkJ a partir da *Pseudomonas putida* GPo1. As sequências gênicas da alcooldesidrogenase codificada pelo gene alkJ a partir do *Pseudomonas putida* GPo1, *Alcanivorax borkumensis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* ou *Roseobacter denitrificans* podem ser consultadas por exemplo no banco de dados do gene KEGG.

[00034]  $\omega$ -transaminases adequadas são, por exemplo, aquelas  $\omega$ -transaminases, que são caracterizadas no documento de patente US-A-2007/0092957 pelos números de sequência 248, 250, 252 e 254.

[00035] Uma enzima preferida EIII, especialmente uma  $\omega$ -transaminase preferida é especialmente a  $\omega$ -transaminase a partir da *Chromobacterium violaceum* DSM30191 (Kaulmann et al, 2007; "Substrate spectrum of  $\omega$ -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 41, Seiten 628-637), que é codificada pela sequência gênica de acordo com SEQ ID N° 01.

[00036] Pode ser vantajoso utilizar como enzima EIII  $\omega$ -transaminases, que podem ser isoladas de plantas. Preferivelmente, neste caso  $\omega$ -transaminases são selecionadas de plantas do grupo contendo *Arabidopsis thaliana*, *Avena sativa*, *Beta vulgaris*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Lotus japonicus*, *Solanum lycopersicum*, *Manihot esculenta*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Spinacia oleracea*, *Arum maculatum*, *Mercurialis perennis* e *Urtica dioica*, sendo especialmente preferida *Arabidopsis thaliana*. Como  $\omega$ -transaminases são indicadas especialmente enzimas que são codificadas por ácidos nucleicos, que apresentam 90 %, preferivelmente 95 %, especialmente preferivelmente 99% e totalmente especialmente preferivelmente 100 % de identidade em relação à sequência de acordo com SEQ ID N° 39. A "identidade de nucleotídeo" relativa ao SEQ ID N° 39 é neste caso, determinada com auxílio de métodos conhecidos. Em geral, são empregados programas de computador especiais com algoritmos levando-se em consideração exigências especiais. Métodos preferidos para a determinação da identidade geram primeiramente a máxima conformidade entre as sequências comparativas. Programas de computador para a determinação da identidade compreendem, porém não são restritos a

isso, o pacote de programa GCG, incluindo

[00037] - GAP (Deveroy, J. et al., Nucleic Acid Research 12 (1984), página 387, Genetics Computer Group University of Wisconsin, Medicine (Wi), e

[00038] - BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. et al., Journal of Molecular Biology 215 (1990), páginas 403-410. O programa BLAST pode ser obtido pelo National Center For Biotechnology Information (NCBI) e também a partir de outras fontes (BLAST Handbuch, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894; Altschul S. et al., acima).

[00039] O algoritmo conhecido de Smith-Waterman também pode ser empregado para a determinação da identidade de nucleotídeo.

[00040] Parâmetros preferidos para a comparação de nucleotídeo compreendem os seguintes:

algoritmo de Needleman e Wunsch, Journal of Molecular Biology 48 (1970), páginas 443-453

matriz comparativa

Matches = + 10

Mismatches = 0

Gap penalty = 50

Gap length penalty = 3

[00041] O programa GAP também é indicado para o uso com os parâmetros acima. Os parâmetros acima são os parâmetros padrão na comparação de sequência de nucleotídeo.

[00042] Além disso, são indicadas enzimas do subgrupo das  $\beta$ -ala: piruvato-transaminases. Delas fazem parte por exemplo, transaminases de *Pseudomonas putida* W619 (gi: 119860707, gi: 119855857, gi: 119856278), de *Pseudomonas putida* KT2440 (gi: 24984391), de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (gi 15595330, gi: 15600506, gi 15595418, gi 9951072); *Streptomyces coelicolor* A3(2) (gi: 3319731), *Streptomyces avermitilis* MA 4680 (gi: 29831094, gi:

29829154) e *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (gi 34102747). As sequências de aminoácidos das transaminases acima citadas são reproduzidas nas sequências de acordo com SEQ ID Nº 19 a SEQ ID Nº 30.

[00043] Para o caso de as células, de acordo com a invenção, serem utilizadas para fabricar ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou lactamas a base de  $\omega$ -aminocarboxílicos partindo de ésteres de ácido carboxílico, é também vantajoso, se a célula, de acordo com a invenção, além da atividade aumentada de pelo menos uma das enzimas EI, EII e EIII, preferivelmente além de uma atividade aumentada da enzima EI e EIII ou EI, EII e EIII também apresentar uma atividade aumentada de uma enzima EIV, que cataliza a reação de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico formando os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos correspondentes, em que se trata no caso desta enzima EIV preferivelmente de esterase, que é secretada preferivelmente pela célula. A secreção da esterase pela célula apresenta a vantagem de a ligação de éster ser clivada somente fora da célula. Desse modo, é possível assegurar que devido à melhor permeabilidade de membrana do éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico em comparação com o ácido  $\omega$ -aminocarboxílico o produto-alvo deixa a célula suficientemente e na qual o meio nutritivo que circunda a célula pode romper.

[00044] Esterases preferidas de acordo com a invenção são principalmente lipases, sendo que como exemplo de uma lipase adequada podemos citar a lipase LipA de *Pseudomonas fluorescenz* HU380 (ACC Code Q76D26, Kojima und Shimizu, "Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 96 (3), páginas 219-226 (2003)). Para assegurar que as esterases serão secretadas, elas poderão ser providas de sequências de sinal de modo

conhecido ao versado na técnica, que garantem uma secreção. Se, por exemplo, a lipase acima citada LipA de *Pseudomonas fluorescenz* HU380 in *E. coli* for super expressada, então ela poderá ser provida vantajosamente de sequências de sinal de EstA, uma esterase, que está presente naturalmente na superfície celular de *Pseudomonas aeruginosa* (Becker et al., "A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes", *FEBS Letters*, Vol. 579, páginas 1177-1182 (2005)). Outras enzimas adequadas são lipases de *C. antarctica*, *M. miehei* e *P. cepacia* (Vaysse et al., "Enzyme and Microbial Technology", Vol. 31, páginas 648-655 (2002)).

[00045] Alternativamente o éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico secretado também pode ser convencionalmente clivado, para obter o ácido  $\omega$ -aminocarboxílico, por exemplo, através de saponificação, ou seja, hidrólise do éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico através da solução aquosa de um hidróxido, por exemplo através do hidróxido de sódio.

[00046] Além disso, verificou-se ser vantajoso de acordo com a invenção, quando a célula, de acordo com a invenção além da atividade aumentada pelo menos de uma das enzimas EI, EII e EIII, preferivelmente além de uma atividade aumentada das enzimas EI e EIII ou EI, EII e EIII e opcionalmente também além de uma atividade aumentada da enzima acima descrita EIV, também apresenta uma atividade aumentada de uma enzima EV, que catalisa a reação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos formando as lactamas correspondentes, em que também neste caso pode ser vantajoso quando essa enzima EV é secretada pela célula. Desse modo, consegue-se que o ácido  $\omega$ -aminocarboxílico formado diretamente pela célula, ou porém, o ácido  $\omega$ -aminocarboxílico formado somente após a clivagem extracelular de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico seja transportado para a lactama correspondente, para facilitar assim opcionalmente a purificação do produto-alvo.

[00047] De acordo com uma outra forma de concretização especial da célula de acordo com a invenção, esta célula, além da atividade aumentada de uma ou várias das enzimas EI, EII ou EIII assim como opcionalmente da atividade aumentada da enzima EIV e/ou EV também apresenta uma atividade aumentada de uma enzima EVI, que catalisa a reação de um ácido  $\alpha$ -cetocarboxílico formando um aminoácido, em que no caso dessa enzima se trata preferivelmente de uma aminoácido-desidrogenase. Uma tal modificação da célula teria a vantagem de esta ser correspondentemente regenerada no caso de uma aplicação de aminoácidos como doadores para o grupo NH<sub>2</sub>, que é usado durante a reação intermediada pela transaminase (EIII) de um ácido  $\omega$ -oxocarboxílico ou de um éster de ácido  $\omega$ -oxocarboxílico, formando o ácido  $\omega$ -aminocarboxílico correspondente ou formando o éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico correspondente. Como aminoácido-desidrogenase é preferida a alanina-desidrogenase de *B. subtilis* (EC Nr. 1.4.1.1; Gene ID: 936557), codificada pela sequência gênica de acordo com SEQ ID N° 02. Outras aminoácido-desidrogenases são serina-desidrogenases, aspartato-desidrogenases, fenilalanina-desidrogenases e glutamato-desidrogenases.

[00048] Também presta uma contribuição para a solução das tarefas inicialmente citadas um método para a fabricação de uma célula geneticamente modificada, compreendendo a etapa de processo do aumento da atividade de pelo menos uma das seguintes enzimas:

i) de uma enzima EI, que catalisa a reação de ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico formando os ácidos  $\omega$ -hidroxicarboxílicos correspondentes ou ésteres de ácido  $\omega$ -hidroxicarboxílico,

ii) de uma enzima EII, que catalisa a reação de ácidos  $\omega$ -hidroxicarboxílicos ou  $\omega$ -ésteres de ácido hidroxicarboxílicos formando

os ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos correspondentes ou ésteres de ácido  $\omega$ -oxocarboxílico, ou

iii) de uma enzima E<sub>III</sub>, que catalisa a reação de ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -oxocarboxílicos formando os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos correspondentes ou ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos, em uma célula, em que o aumento das atividades enzimáticas é feito preferivelmente através dos métodos inicialmente descritos.

[00049] De acordo com uma forma de concretização especial do método acima descrito, no caso desse método, além do aumento da atividade das enzimas E<sub>I</sub>, E<sub>II</sub> e/ou E<sub>III</sub> a atividade de uma enzima E<sub>IV</sub>, que catalisa a reação de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico formando os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos correspondentes, e/ou de uma enzima E<sub>V</sub>, que catalisa a reação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos formando as lactamas correspondentes, também é aumentada pela elevação da expressão dessa enzima, em que as enzimas E<sub>IV</sub> e/ou E<sub>V</sub> são preferivelmente secretadas pela célula.

[00050] Também prestam uma contribuição para a solução das tarefas inicialmente referidas as células geneticamente modificadas, que podem ser obtidas através do método acima descrito.

[00051] Presta uma outra contribuição para a solução das tarefas inicialmente citadas um método para a fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, contendo as seguintes etapas de processo de:

I) colocar em contato uma célula, de acordo com a invenção com um meio de cultura contendo um ácido carboxílico e um éster de ácido carboxílico ou com um meio de cultura contíguo a uma fase orgânica contendo um ácido carboxílico ou um éster de ácido carboxílico sob certas condições, que possibilitam à célula, formar a

partir do ácido carboxílico ou a partir do éster de ácido carboxílico ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou lactamas derivadas de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos;

II) opcionalmente isolar os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos formados, o éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou a lactama derivada de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílico.

[00052] Na etapa de processo I) do método de acordo com a invenção as células são colocadas em contato primeiramente com um meio de cultura contendo um ácido carboxílico ou um éster de ácido carboxílico ou com um meio de cultura adjacente a uma fase orgânica contendo um ácido carboxílico ou um éster de ácido carboxílico, em que esta etapa de colocar em contato é feita sob determinadas condições que possibilitam à célula formar a partir do ácido carboxílico ou a partir do éster de ácido carboxílico formar ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos.

[00053] As células geneticamente modificadas, de acordo com a invenção podem ser colocadas em contato e portanto cultivadas continua ou descontinuamente no método por batelada (cultivo em batelada) ou no método fed-batch (cultivo contínuo alimentado) ou no método repeated-fed-batch (cultivo contínuo alimentado repetitivo) para a produção de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos com o meio nutritivo. Também é possível um método semi-contínuo, conforme é descrito no documento de patente GB-A-1009370. É apresentado um resumo sobre os métodos conhecidos de cultivo no livro didático den Chmiel ("Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik" (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) ou no livro de Storhas ("Bioreaktoren e periphere Einrichtungen", Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).

[00054] O meio de cultura a ser empregado deve atender adequadamente as reivindicações das respectivas cepas. Descrições de meios de cultura de diferentes micro-organismos são apresentadas no manual "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981).

[00055] Como fonte de carbono, além dos ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico, também podem ser empregados hidratos de carbono como por exemplo glicose, sacarose, lactose, frutose, maltose, melão, amido e celulose, óleos e gorduras como por exemplo óleo de soja, óleo de girassol, óleo de amendoim e gordura de coco, ácidos graxos como por exemplo ácido palmitínico, ácido estearínico e ácido linólico, alcoóis como por exemplo glicerina e metanol, hidrocarbonetos como metano, aminoácidos como L-glutamato ou L-valina ou ácidos orgânicos como por exemplo ácido acético. Essas substâncias podem ser empregadas individualmente ou como mistura. É especialmente preferida a aplicação de hidratos de carbono, especialmente de monossacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos, conforme descrito no documento de patente US 6.01.494 e US 6.136.576, de açúcares C5 ou de glicerina.

[00056] Como fonte de nitrogênio podem ser empregados compostos orgânicos contendo nitrogênio tais como peptona, extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, água de maceração de milho, rações de soja e ureia ou compostos inorgânicos tais como sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, carbonato de amônio e nitrato de amônio. As fontes de nitrogênio podem ser empregadas individualmente ou como mistura.

[00057] Como fonte de fósforo podem ser empregados ácido fosfórico, hidrogênio fosfato potássico ou hidrogênio fosfato dipotássico ou os sais contendo sódio correspondentes. O meio de cultura deve conter além disso sais de metais como, por exemplo,

sulfato de magnésio ou sulfato de ferro, que são necessários para o crescimento. Finalmente, podem ser utilizados estimulantes de crescimento essenciais tais como aminoácidos e vitaminas adicionalmente às substâncias acima referidas. Podem ser também adicionados estágios preliminares ao meio de cultura. Os aditivos referidos podem ser adicionados à cultura na forma de formulação única ou são supridos adicionalmente adequadamente durante o cultivo.

[00058] Para o controle do pH da cultura são utilizados adequadamente compostos básicos tais como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, amoníaco ou água de amoníaco ou compostos ácidos tais como ácido fosfórico ou ácido sulfúrico. Para o controle do desenvolvimento de espuma podem ser utilizados agentes anti-espumantes tais como por exemplo poliglicoléster de ácido graxo. Para a conservação da estabilidade de plasmídeos podem ser adicionadas, ao meio, substâncias adequadas de ação seletiva como por exemplo antibióticos. Para conservar as condições aeróbias, são colocados na cultura oxigênio ou misturas gasosas contendo oxigênio como por exemplo ar. A temperatura da cultura normalmente situa-se em 20°C a 45°C e preferivelmente em 25°C a 40°C.

[00059] De acordo com uma forma de concretização especialmente preferida do método de acordo com a invenção para a fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos ou de lactamas derivadas de  $\omega$ -aminocarboxílicos, na qual é utilizada como célula de acordo com a invenção uma célula recombinante, que deriva de uma célula E. coli, é utilizado como meio nutritivo um meio de sal mineral suplementado com ampicilina, cloroamfenicol e canamicina segundo Riesenberget al., "High cell density fermentation of recombinant Escherichia coli expressing human interferon alpha 1", Appl Microbiol and Biotechnol, Vol. 34 (1), Seiten 77-82 (1990)).

[00060] O colocar em contato das células de acordo com a invenção, com o meio de cultura na etapa de processo I) é feito preferivelmente sob condições que possibilitam à célula, a partir do ácido carboxílico ou do éster de ácido carboxílico formar ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos. Como ácidos carboxílicos ou éster de ácido carboxílico podem ser usados especialmente ácidos carboxílicos com um número de carbonos em uma faixa de 6 a 20, especialmente preferivelmente de 6 a 15, especialmente de 6 a 12, em que o ácido láurico é especialmente preferido como ácido carboxílico. Como éster de ácido carboxílico podem ser usados especialmente o metiléster ou etiléster dos ácidos carboxílicos acima referidos, em que o metiléster do ácido láurico é especialmente preferido como éster de ácido carboxílico.

[00061] No caso da fabricação dos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, do éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou da lactama derivada de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos na etapa de processo I), são possíveis diferentes procedimentos.

[00062] De acordo com uma forma de concretização do método, de acordo com a invenção, as células são primeiramente cultivadas para o fim da produção de biomassa em um meio nutritivo, que não contém ácidos carboxílicos ou éster de ácido carboxílico, especialmente nenhum dos ácidos carboxílicos ou éster de ácido carboxílico preferidos acima referidos. Somente após obter uma determinada biomassa os ácidos carboxílicos ou éster de ácido carboxílico são adicionados ao meio nutritivo ou as células são colocadas em contato com um novo meio nutritivo contendo ácidos carboxílicos ou éster de ácido carboxílico. Neste contexto é especialmente preferido que o conteúdo de ácidos carboxílicos ou de ésteres de ácido carboxílico durante a formação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, de éster de ácido

$\omega$ -aminocarboxílico ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos preferivelmente situe-se em uma faixa de 1 a 200 g/l, especialmente preferivelmente em uma faixa de 20 a 200 g/l.

[00063] De acordo com uma outra forma de concretização do método de acordo com a invenção este é realizado em um sistema bifásico, contendo

A) uma fase aquosa, assim como

B) uma fase orgânica,

em que a formação dos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, dos ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou da lactama derivada de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos é feita através das células na etapa de processo I) na fase aquosa e os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos formados, os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos formados ou as lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos se concentram na fase orgânica. Desse modo é possível, extrair *in situ* os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos formados, os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico formados e as lactamas formadas, derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos.

[00064] Também no caso dessa forma de concretização do método de acordo com a invenção mostrou-se vantajoso cultivar as células primeiramente para o fim da produção de biomassa em um meio nutritivo, que não contém especialmente nenhum dos ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico preferidos, acima referidos. Somente após a obtenção de uma determinada biomassa a suspensão celular como fase aquosa A) é então colocada em contato com a fase orgânica B), sendo que especialmente a fase orgânica B) contém o ácido carboxílico ou o éster de ácido carboxílico preferivelmente em uma quantidade em uma faixa de 1 a 200 g/l, especialmente preferivelmente em uma faixa de 20 a 200 g/l. Se, porém, como ácidos carboxílicos ou como ésteres de ácido carboxílico

forem utilizados substratos, que não são tóxicos para as células empregadas, tal como metiléster de ácido láurico, então o conteúdo da fase orgânica nesses ácidos carboxílicos ou éster de ácido carboxílico deverá ser significativamente mais elevado. Neste caso, pode ser possível utilizar como fase orgânica o ácido carboxílico puro ou o éster de ácido carboxílico puro, por exemplo, o metiléster de ácido láurico.

[00065] Como fase orgânica, podem ser empregados alcanos de comprimento médio de cadeia, preferivelmente aqueles com um valor logP superior a 4 (pouca formação de espuma), ou aromatos fisicamente semelhantes ou éster de aromato, preferivelmente porém, conforme acima relacionado, éster de ácido láurico, especialmente preferivelmente metiléster de ácido láurico, BEHP (Bis(2-etilhexil)ftalato) ou éster de ácido graxo de cadeia longa (Biodiesel).

[00066] Além disso, é preferido de acordo com a invenção, que o meio nutritivo utilizado na etapa de processo I) contenha pelo menos durante a fase da formação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, de éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, doadores de grupos amino, tal como amoníaco ou íons de amônio ou porém aminoácidos, especialmente alanina ou aspartato, que funcionam como doadores de amina na reação catalisada pela transaminase dos ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos ou dos ésteres de ácido  $\omega$ -oxocarboxílico formando os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos correspondentes ou ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico correspondente.

[00067] Na etapa de processo II) do método, de acordo com a invenção, os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos formados, os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico formados ou as lactamas derivadas dos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos são opcionalmente isolados, em que é preferido que esse isolamento seja feito por um processo de purificação pelo menos bifásico, compreendendo

a) uma etapa de extração, na qual os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou as lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos sejam extraídos do meio de cultura, assim como

b) uma etapa de depuração fina, na qual o extrato obtido na etapa de processo a) é ainda mais purificado através de uma processo de destilação ou de uma cristalização seletiva sob obtenção de uma fase de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico, de uma fase de éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou de uma fase de lactama com uma pureza de pelo menos 99,8 %.

[00068] A extração na etapa de processo a) pode ser configurada especialmente como assim chamada “extração *in situ*”, na qual a etapa de processo I) e II) do método, de acordo com a invenção, para a fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos são feitas simultaneamente. Esta extração “*in situ*” já foi descrita anteriormente.

[00069] A depuração fina na etapa de processo II) pode ser feita por exemplo através de uma destilação ou cristalização.

[00070] Em uma forma especial de concretização do método de acordo com a invenção de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico formados na etapa de processo I) são reagidos em uma outra etapa de processo com métodos químicos convencionais formando ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos; o método químico preferido é a saponificação, na qual o éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico é reagido com uma solução aquosa de uma base, preferivelmente de um hidróxido, preferivelmente hidróxido de sódio, formando o ácido  $\omega$ -aminocarboxílico.

[00071] É preferivelmente utilizado este método para a fabricação de ácido  $\omega$ -aminoláurico a partir de ésteres de ácido láurico, preferivelmente a partir de metiléster de ácido láurico;

[00072] Prestam uma contribuição para a solução das tarefas inicialmente mencionadas também ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, que podem ser obtidos através dos métodos anteriormente descritos, em que no caso da lactama se trata preferivelmente de Laurinlactama, que é obtida, quando na etapa de processo I) do método de acordo com a invenção para a fabricação de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, são utilizados ácidos láuricos ou éster de ácido láurico como ácido carboxílico ou éster de ácido carboxílico, em que no caso do ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos trata-se preferivelmente de ácido  $\omega$ -aminoláurico e em que no caso do éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico trata-se preferivelmente de éster de ácido  $\omega$ -aminoláurico.

[00073] Presta uma contribuição para a solução das tarefas inicialmente mencionadas também um método para a fabricação de poliamidas a base de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, compreendendo as seguintes etapas:

( $\alpha$ 1) fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos através de um dos métodos anteriormente descritos para a fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, especialmente através dos métodos anteriormente descritos para a fabricação de ácido  $\omega$ -aminoláurico a partir de ácido láurico ou ésteres de ácido láurico;

( $\alpha$ 2) polimerização do ácido  $\omega$ -aminocarboxílico sob obtenção de uma poliamida.

[00074] Na etapa de processo ( $\alpha$ 2) do método de acordo com a invenção para a fabricação de poliamidas a base de ácidos  $\omega$ -

aminocarboxílicos, os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos obtidos na etapa de processo ( $\alpha 1$ ), especialmente os ácidos  $\omega$ -aminoláuricos obtidos na etapa de processo ( $\alpha 1$ ), são reagidos em uma polimerização formando uma poliamida, sendo que opcionalmente também podem ser utilizadas misturas feitas de diferentes ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, dos quais pelo menos um dos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, opcionalmente também todos os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos foram fabricados através do método de acordo com a invenção para a fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos.

[00075] A fabricação das poliamidas a partir dos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos pode ser feita através de um método conhecido em si, tal como são descritos em L. Notarbartolo, Ind. Plast. Mod. 10(1958)2, S. 44, JP 01-074224, JP 01-051433, JP63286428, JP58080324 ou JP60179425.

[00076] Presta também uma contribuição para a solução das tarefas inicialmente referidas um método para a fabricação de poliamidas a base de lactamas, compreendendo as seguintes etapas de processo:

( $\beta 1$ ) fabricação de lactamas através do método acima descrito para a fabricação de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, especialmente através do método acima descrito para a fabricação de laurinelactamas derivadas de ácido láurico ou de ésteres de ácido láurico;

( $\beta 2$ ) polimerização por abertura de anel ou policondensação da laurinelactama sob obtenção de uma poliamida.

[00077] Na etapa de processo ( $\beta 2$ ) do método, de acordo com a invenção, para a fabricação de poliamidas a base de lactamas, as lactamas obtidas na etapa de processo ( $\beta 1$ ), especialmente as laurinelactamas obtidas na etapa de processo ( $\beta 1$ ) são reagidas em uma polimerização por abertura de anel ou por policondensação

formando uma poliamida, sendo que opcionalmente misturas de diferentes lactamas, por exemplo misturas de laurilactama e  $\epsilon$ -caprolactama podem ser utilizadas, das quais pelo menos uma das lactamas, opcionalmente também todas as lactamas foram fabricadas através do método para a fabricação de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos da presente invenção.

[00078] A fabricação das poliamidas derivadas das lactamas pode ser feita através de métodos em si conhecidos, tal como são descritos por exemplo nos documentos de patente DE-A-14 95 198, DE-A-25 58 480, EP-A-0 129 196 ou em "*Polymerization Processes*", Interscience, New York, 1977, Seiten 424-467, especialmente páginas 444-446.

[00079] Prestam também uma contribuição para a solução das tarefas inicialmente referidas, poliamidas, que podem ser obtidas através dos métodos anteriormente descritos. Neste caso, é especialmente preferido que essas poliamidas sejam a base de pelo menos 10 % em peso, especialmente preferivelmente de pelo menos 25% em peso, ainda mais preferivelmente de pelo menos 50 % em peso e o mais preferivelmente de pelo menos 75% em peso de ácido láurico, éster de ácido láurico ou laurilactama, que foi obtido através dos métodos de acordo com a invenção para a fabricação de ácido láurico, de éster de ácido láurico ou de laurilactama derivadas de ácido láurico ou de éster de ácido láurico.

[00080] A invenção é mais detalhadamente esclarecida com auxílio de Figuras e exemplos de caráter não restritivo, onde:

a Figura 1 apresenta uma ilustração esquemática de um plasmídeo recombinante para a integração cromossomal dos genes *alk* na *Escherichia coli* (tnp: gene transposase; bla: gene com resistência à ampicilina, oriT RP4: região de mobilização; I e O marcam os "*inverted repeats*" do mini-transposons Tn5).

a Figura 2 mostra a ilustração esquemática de um

plasmídeo recombinante para a expressão da transaminase e da alanina-desidrogenase sob o controle de um promotor induzível a arabinose (bla: gene resistente a ampicilina; CV2025: Gen fur  $\omega$ -Transaminase aus *Chromobacterium violaceum*; ald: Gen fur Alanin-Dehydrogenase aus *B. subtilis*; araC: Transkriptionsregulator).

a Figura 3 mostra a ilustração esquemática de um plasmídeo recombinante para a expressão de LipA em *E. coli* e ilustração da enzima na superfície celular (colE1, ColE1: origem de replicação; estA\*, estA: gene com troca de aminoácido alanina por serina (Codon #38), cat: gene resistente Cloramfenicol; phoA: segmento gênico codifica para a sequência líder da fosfatase alcalina).

a Figura 4 mostra a determinação de atividade da *C. violaceum*-transaminase derivada do ensaio enzimático. A determinação da atividade foi realizada em determinação dupla (activ1, activ2) no fotômetro. Como controles negativos, foi empregada uma formulação sem o co-substrato L-alanina (o.Cos), uma formulação com enzima inativada por aquecimento (inativa) e uma formulação de *E. coli* cultura de expressão com vetor vazio (vetor vazio), purificada analogamente ao omega-TA.

a Figura 5 mostra um cromatograma do substrato metiléster de ácido 12-aminoláurico no início da medição de referência (acima) e após 2 horas incubação com a transaminase purificada (abaixo).

A Figura 6 mostra cromatograma do substrato de metiléster de ácido 12-aminoláurico após 24 horas (acima) do ensaio enzimático e após aumento do substrato (controle, abaixo).

a Figura 7 mostra 6 cromatogramas do substrato de metiléster de ácido 12-aminoláurico após a inativação por aquecimento da enzima (acima) e após 0h (abaixo).

a Figura 8 mostra o plasmídeo de partida pGEc47, que foi utilizado como modelo para a amplificação de alkBGTS.

a Figura 9 mostra os iniciadores ( ) utilizados e os produtos PCR deles resultantes alkBFG e alkT.

a Figura 10 mostra o vetor recombinante pBT10, que foi utilizado para a síntese de metiléster de ácido hiroxiláurico e metiléster de ácido oxoláurico.

a Figura 11 mostra um cromatograma GC do padrão metiléster de ácido 12-oxo-láurico.

a Figura 12 mostra um cromatograma GC do padrão do metiléster de ácido 12-hidroxiláurico.

a Figura 13 mostra um cromatograma da fase orgânica da biotransformação de uma célula inativa no bioreator de metiléster de ácido láurico, tempo 0 min.

a Figura 14 mostra um cromatograma da fase orgânica da biotransformação de uma célula inativa no bioreator de metiléster de ácido láurico, tempo 150 min.

a Figura 15 mostra o vetor de expressão pGJ3130 com AT3G22200.

a Figura 16 mostra a comprovação da atividade enzimática através do ensaio enzimático acoplado (inativo, proteína inativada por aquecimento; o.Cos., sem adição de alanina; akt, a enzima ativa purificada).

a Figura 17 mostra a comprovação da proteína expressa de forma heteróloga AT3G22200 por HPLC. Acima: produto após 20 minutos de incubação em 10,8 minutos; abaixo: substância de referência em 10,8 minutos.

a Figura 18 mostra o mapa do plasmídeo do vetor de expressão pET-21a(+) com o gene transaminase ppta5 (pPPTA5).

a Figura 19 mostra o mapa do plasmídeo dos vetores de expressão pET-21a(+) com o gene transaminase psta (pPSTA).

a Figura 20 mostra a aminação de metiléster de ácido 5mM

12-oxoláurico com a transaminase PPTA5. Para a avaliação foram somadas as superfícies de pico de metiléster de ácido 12-oxo- e 12-aminoláurico a partir dos cromatogramas obtidos da extração neutra e ácida e calculada a porcentagem de extrato ou produto.

a Figura 21 mostra a aminação de metiléster de ácido 5 mM 12-oxoláurico com a transaminase PSTA. Para a avaliação foram somadas as superfícies de pico de metiléster de ácido 12-oxo- e 12-aminoláurico a partir dos cromatogramas obtidos da extração neutra e ácida e calculada a porcentagem de extrato ou produto.

#### EXEMPLOS

##### A.Reação de ácido láurico ou metiléster de ácido láurico formando laurinlactama

[00081] Para a reação de ácido láurico ou do metiléster de ácido láurico formando a laurinlactama *E. coli* é complementada com as enzimas necessárias mono-oxigenase, alcooldesidrogenase,  $\omega$ -transaminase, alaninadesidrogenase e uma lipase. As enzimas são super expressadas em *E. coli*, sendo que os níveis de expressão das enzimas individuais depende da cinética das reações individuais e precisam ser coordenadas entre si de forma ideal. O ajuste do nível de expressão é feito através da adição da quantidade de indutor correspondente. A expressão da mono-oxigenase e da alcooldesidrogenase é induzida com n-octano, a transaminase e a alaninadesidrogenase são induzidas com arabinose e a lipase com IPTG.

##### A1. Clonagem das enzimas individuais

###### Hidroxilação e formação de aldeído

[00082] Para a hidroxilação do ácido láurico ou do metiléster de ácido láurico é empregado o sistema de alcanohidroxilase *alkBGT* de *Pseudomonas putida* GPo1. A segunda etapa em relação ao aldeído é catalisada através da álcool-desidrogenase *alkJ*.

[00083] Os genes necessários para essas reações *alkBGJT* são

integrados na *E. coli* mediante inserção na mini-transposon Tn5 cromossomal no genoma de *E. coli* (de Lorenzo et al., J Bacteriol., Vol. 172 (11), Seiten 6568-6572 und 6557-6567 (1990); Panke et al., Appl and Environm. Microbiol., Seiten 5619-5623 (1999)). Neste caso, os genes devem ser expressos sob o controle do promotor *alkB* e do regulador positivo *alkS*. A transferência do construto Tn5-*alkBGFJST* para o organismo-alvo *E. coli* é feita com auxílio do plasmídeo mobilizável pUT-Km Panke et al., 1999 s. o.).

[00084] O locus *alkST* com o regulador *alkS* relevante para a expressão é organizado fora do operon *alkBFGHJKL* e disposto no genoma de *Pseudomonas putida* em sentido oposto. O arranjo dos genes no caso da clonagem está contido no plasmídeo portador do transposon. Os fragmentos *alkST* e *alkBFGJ* são consecutivamente integrados no plasmídeo.

[00085] Os genes a serem clonados *alkB* (SEQID Nº 03) *alkG* (SEQ ID Nº 04) e *alkJ* (SEQ ID Nº 05) são organizados na *P. putida* na verdade em conjunto no operon *alkBFGHJKL*, mas são separados pelo gene *alkH*, que codifica uma aldeído-desidrogenase. Essa enzima decomporia novamente o produto intermediário desejado, o aldeído do ácido láurico e por isso precisa ser excluído da clonagem dos genes *alkBGJ*.

[00086] Para simplificar a clonagem de *alkB* e *alkG* o gene disposto entre eles *alkF* é amplificado junto com *alkB* e *alkG* e clonado. *AlkF* não tem importância para a reação a ser catalizada. Os genes *alkBFG* e *alkJ* são amplificados em duas formulações PCR e fusionados entre si por SOE-PCR (Horton et al., Gene, Vol. 77, páginas 61-68 (1989)). Como DNA-alvo serve o plasmídeo OCT de *Pseudomonas putida* GPo1.

#### A2. Estratégia de clonagem:

[00087] Amplificação PCR do fragmento *alkST* = 4077 bp (SEQ ID Nº 06 (*alkS*) e SEQ ID Nº 07 (*alkT*)) com interface *NotI* a montante de

*alkT*:

Iniciador

*alkT*-forward-*NotI* (SEQ ID N° 08)

5' ACGTAGCGGCCCGCCTAATCAGGTAATTTTATAC

*alkS*-reverse (SEQ ID N° 09)

5' GAGCGAGCTATCTGGT

[00088] O fragmento PCR é clonado no vetor portador de transposon pUT-Km. Para tanto, o vetor é cortado dentro de *Tn5* com *NotI* e ligado por ligação *blund-end* com o fragmento *alkST*. O plasmídeo recombinado traz a denominação pUT-Km-*alkST*.

A3. Síntese de construto *alkBFGJ* com a técnica do SOE-

PCR:

[00089] Síntese de fragment 1: *alkBFG* + promotor a montante *alkB* e interface *NotI* no terminal 5'- (tamanho do produto: 1409 bp):

Iniciador

*alkBFG*-forward-*NotI* (SEQ ID N° 10)

5' TCGTAGCGGCCCGCCCAGCAGACGACGGAGCAA

*alkBFG*-reverse-SOE (SEQ ID N° 11)

5' ATTTTATCTTCTCGAGGCTTTTCCTCGTAGAGCACAT

[00090] Síntese de fragmento 3, *alkJ* com terminal complementar a *alkG* no terminal 5' e interface *NotI*-no terminal 3' (tamanho de produto: 1723 bp):

Iniciador

*alkJ*-forward-SOE (SEQ ID N° 12)

5'TGCTCTAACGAGGAAAAGCCTCGAGAAGATAAAATGT

A

*alkJ*-reverse-*NotI* (SEQ ID N° 13)

5' ATTGACGCGGCCGCTTACATGCAGACAGCTATCA

[00091] Os dois fragmentos individuais são fusionados entre si por SOE-PCR. (necessárias 3 reações PCR separadas). O plasmídeo

recombinante pUT-Km-*alkST* e o construto *alkBFGJ* são cortados com *NotI* e ligados. O novo plasmídeo recombinante pUT-Km-*alkBGJST* (vide Figura 1) é transformado na *E. coli* HB101 e transferido por transferência de plasmídeo conjugativa para *E. coli* JM101.

#### A4. Aminoação e regeneração do doador de amino

[00092] Para a aminoação em relação ao éster de ácido  $\omega$ -aminoláurico e a regeneração do doador de amino a *E. coli* cepa JM101 que porta Tn5:*alkBGJST* é adicionalmente transformada com o plasmídeo recombinante pBAD-CV2025-*ald*. Esse plasmídeo baseia-se no vetor pBAD30 (Guzman *et al.*, “*Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P<sub>BAD</sub> Promotor*”, *J. Bacteriol.*, Vol. 177 (14), Seiten 4121-4130 (1995)). pBAD-CV2025-*ald* porta o gene para a transaminase CV2025 de *Chromobacterium violaceum* DSM30191 (SEQID Nº 01; Kaulmann *et al.*, *Enzyme and Microbial Technology* Vol. 41, páginas 628-637 (2007) e o gene *ald*, que codifica para uma alaninadesidrogenase de *Bacillus subtilis subsp. Subtilis* (SEQ ID Nº 02; NP\_391071). Os genes ficam sob controle de um promotor induzível por arabinose.

#### A5. Estratégia de clonagem

[00093] Amplificação de PCR do gene transaminase com DNA cromossomal de *Chromobacterium violaceum* DSM30191 (tamanho de produto: 1415 bp):

Iniciador

CV2025-forward-*SacII* (SEQ ID Nº 14)

5'

CGAGGAGCTCAGGAGGATCCAAGCATGCAGAAGCAACGTACG

CV2025-reverse-*KpnI* (SEQ ID Nº 15)

5' GTCATGTACCCCTAAGCCAGCCCGCGCGCCT

[00094] Para a clonagem no vetor pBAD30 o iniciador *forward* além da interface *XbaI* também contém um local de ligação ao ribossomo. A

ligação no vetor pBAD30 é feita através das interfaces *SacI* e *KpnI*. O vetor recombinante traz a denominação pBAD-CV2025.

[00095] Amplificação PCR do gene alanina-desidrogenase *ald* com DNA cromossomal de *B. subtilis subsp. Subtilis* (NP\_391071) (tamanho de produto: 1171 bp).

Iniciador

*AlaDH-foward-XbaI* (SEQ ID Nº 16)

5'

ACCTATCTAGAAGGAGGACGCATATGATCATAGGGGTTC CT

*AlaDH-reverse-PstI* (SEQ ID Nº 17)

5' AACCTCTGCAGTTAAGCACCCGCCAC

[00096] Para a clonagem no vetor recombinante pBAD-CV2025 o iniciador *foward* além da interface *XbaI* também contém um local de ligação ao ribossomo. A clonagem no vetor é feita através das interfaces *XbaI* e *PstI*. O plasmídeo resultante traz a denominação pBAD-CV2025-*ald* (vide Figura 2).

A6. Clonagem alternativa do gene omega-transaminase de *Chromobacterium violaceum* DSM 30191 para expressão códon-otimizada em *E.coli*

[00097] O gene que codifica para a omega-transaminase foi sintetizado mediante otimização com códon-usage pela Fa. Geneart para *E. coli* (SEQ ID Nº 42) e clonado no vetor pGA15 (tipo de gene). Neste caso, no caso da síntese do gene, as interfaces *SacI* e *KpnI* são flanqueadas e clonadas após digestão com *SacI* e *KpnI* no vetor pGA15 anteriormente linearizado com *SacI* e *KpnI*. O vetor resultante foi digerido com as endonucleases de restrição *SacI* e *KpnI*, o fragmento (transaminase) purificado e ligado no vetor de expressão paCYCDuet-1 (Novagen).

[00098] Através da análise de restrição os plasmídeos corretos foram examinados. O vetor resultante chama-se paCYCDuet-1::omega transaminase.

#### A7. Purificação de proteína expressa de forma heteróloga por 6xHis-Tag

[00099] Após transformação do vetor (paCYCDuet-1::omega transaminase )em *E. coli* XL1blue a cepa transformada foi cultivada no meio YT duplicado (dYT) com o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) sob 28°C até uma densidade de OD600 nm=0,3-0,4. A expressão é feita sob o controle do promotor  $P_{lac}$  e induzida com IPTG (concentração final 1 mM). Lise da cultura de expressão em bactéria: 50 mL de cultura foram removidos por centrifugação a 2360 x g, e em seguida resuspenso em 5 mL de tampão de sódio (pH 8) com 5 mM EDTA, 300 mM NaCl e 1 mg/mL de lisozima, incubados durante 1h sob temperatura ambiente. O lisato foi centrifugado a 2360 x g durante 10 minutos e o excedente foi purificado através de uma coluna do tipo Protino Ni-TED 2000 Packed Column (segundo informações do fabricante; Macherey-Nagel, Duren). A concentração de proteína foi determinada por meio de Bradford.

#### A8. Comprovação da atividade enzimática através de um ensaio acoplado

[000100] A atividade foi determinada em um ensaio acoplado, no qual o piruvato que precipita como produto secundário da reação de transaminase continua sendo reagido em uma segunda etapa, sendo que NADH é oxidado formando NAD<sup>+</sup>. A redução da concentração de NADH (princípio: medição da queda de extinção) é medida no fotômetro em 340 nm e serve como medida da atividade.

AFormulação	
50 mM	fosfato de sódio pH 7,5
550 mM	L-alanina
100 µM	piridoxalfosfato
250 µg	metiléster de ácido 12-oxododecanoico
1,25 mM	NADH
10 U	lactatodesidrogenase
10 µg	proteína expressa heteróloga
Preencher com H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> até 1 mL	

[000101] O ensaio foi iniciado mediante adição de 5 µL de 12-ODME (50 mg/mL). A medição é feita continuamente a cada minuto em 340 nm sob temperatura ambiente por até no máximo 20 minutos.

[000102] Para o controle, foi empregada proteína inativada e uma formulação sem co-substrato.

[000103] Na Figura 4 a alteração de extinção pode ser acompanhada por fotômetro.

#### A9. Comprovação da proteína expressa de forma heteróloga por HPLC

Formulação	
50 mM	fosfato de sódio pH 7,5
50 mM	L-alanina
100 µM	piridoxalfosfato
250 µg	metiléster de ácido 12-oxododecanoico
50 µg	proteína expressa de forma heteróloga
Preencher com H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> até 500 µL	

[000104] Após incubação por 4h sob temperatura ambiente a reação foi paralisada com 1 Vol. De MeOH

[000105] Para a análise por HPLC a formulação foi derivatizada com o-ftaldialdeído (oPA) e desta analisados 250 µL. Como eluente A foi empregado 50 mM NaAC pH 4:acetonitrila 4:1 (v:v).

[000106] Eluente B era acetonitrila com 5 % de 50 mM NaAC pH 4. O gradiente passou de 30 % B para 60 % B em 4 minutos, de 60% B para 100% B em 2 minutos. A taxa de fluxo foi de 1,2 mL/min. A separação foi feita através de colunas Agilent Zorbax RP18 (Agilent Technologies, USA), a temperatura de coluna era de 40°C.

[000107] As Figuras 5 e 6 mostram o padrão assim como a diminuição do metiléster de ácido 12-oxoláurico. Como controle negativo serve a enzima inativada por aquecimento (Figura 7).

#### A6. Clivagem de éster

[000108] Para a clivagem do metiléster de ácido  $\omega$ -aminoláurico formando o ácido  $\omega$ -aminoláurico é utilizada a Lipase LipA (Q76D26) de *Pseudomonas fluorescenz* (Kojima & Shimizu, *J. of Bioscience and Bioengin.*, Vol. 96 (3), Seiten 219-226 (2003)). O gene é amplificado com os iniciadores LipA-SfiI-up e LipA-SfiI-down com DNA cromossomal de *Pseudomonas fluorescenz* e clonado pelas interfaces SfiI no vetor pEST100. O plasmídeo recombinante leva a denominação pEST-*lipA* (vide Figura 3).

[000109] Através da clonagem *lipA* (SEQ ID Nº 18) é fusionado na sequência de sinal da fosfatase alcalina *phoA* e ao domínio autotransportador Domäne de EstA, uma esterase de *P. aeruginosa*, de forma que a lipase seja transferida através da membrana de citoplasma e representada na superfície celular da *E. coli*. Quanto ao procedimento vide Becker *et al*, "A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes", *FEBS Letters* Vol. 579, páginas 1177-1182 (2005). A expressão é feita sob o controle do promotor  $P_{lac}$  e é induzida com IPTG (concentração final 1 mM) (tamanho do produto: 1894 bp).

Iniciador

Iniciador *lipA*-SfiI-up (SEQ ID Nº 19)

5'

AACAAAAGGGCCGCAATGGCCATGGGTGTGTATGACTAC

Iniciador *lipA*-Sfi-down (SEQ ID N° 20)

5'

TACAGGGGGCCACCACGGCCTCAGGCGATCACAATTCC

B Síntese de metiléster de ácido 12-hidroxiláurico e metiléster de ácido 12-oxoláurico partindo de metiléster de ácido láurico com o sistema AlkBGT Alcanohidroxilase da *Pseudomonas putida* GPo1

#### B1. Construção dos vetores de expressão *lkBGT*

Partindo de pCOM

[000110] Partindo dos sistemas pCOM (Smits *et al.*, 2001 Plasmid 64:16-24) foi fabricado o construto pBT10 (Figura 10, SEQ ID N°31), que contém os três componentes necessários para a oxidação formando aldeído, a saber, alcano-hidroxilase (AlkB), rubredoxina (AlkG) e rubredoxina-reductase (AlkT) da *Pseudomonas putida*. Para a expressão dos três genes foi colocada a sequência gênica *alkBFG* sob o controle do promotor *alkB* e o gene *alkT* sob o controle do promotor *alkS*.

#### B2. Estratégia de clonagem:

[000111] Para a simplificação da clonagem de *alkB* e *alkG* o gene situado entre eles *alkF* foi amplificado junto com *alkB* e *alkG* e clonado. *AlkF* não é importante para a reação a ser catalizada.

[000112] A amplificação por PCR do fragmento *alkBFG* = 2524 bp (vide SEQ ID N° 03 (*alkB*) e SEQ ID N° 04 (*alkG*)) com interface *NdeI* a montante de *alkB* e interface *Sall*-a jusante de *alkG*:

Iniciador: *alkBFG* forward (SEQ ID N° 32)

AAGGGAATTCCATATGCTTGAGAAACACAGAGTTC

Iniciador: *alkBFG* reverse (SEQ ID N° 33)

AAAATTCGCGTCGACAAGCGCTGAATGGGTATCGG

Amplificação por PCR do fragmento *alkT* (2958 bp) (vide

SEQ ID N° 07 (*alkT*)

Iniciador *alkT* forward (SEQ ID N° 34)

TGAGACAGTGGCTGTTAGAG

Iniciador *alkT* reverse (SEQ ID N° 35)

TAATAACCGCTCGAGAACGCTTACCGCCAACACAG

[000113] A amplificação dos fragmentos *alkBFG* e *alkT* é feita por meio de PCR. Como padrão foi utilizado o plasmídeo pGEc47 (Figura 12) (Eggink *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262, 17712-17718).

[000114] As clonagens foram realizadas por meio de vetor de sub-clonagem pSMART® HCKan (Lucigen Corporation). Esta etapa adicional foi necessária, já que a clonagem direta não tinha sido bem sucedida. Para tanto, o vetor pSMART® HCKan (Lucigen) disponível comercialmente e já linerizado e provido de blunt-end foi ligado com o respectivo produto PCR Blunt-End (Figura 9).

[000115] Em seguida, o fragmento *alkBFG* foi cortado com as enzimas de restrição NdeI e Sall e o fragmento *alkT* com as enzimas de restrição PaeI e XhoI, para fora dos vetores de sub-clonagem. Os fragmentos foram separados no gel de agarose (1%), retirados do gel e isolados por meio do kit de extração em gel.

[000116] Os fragmentos foram ligados sucessivamente no vetor pCOM10 (Smits, T. H. M., Seeger, M. A., Witholt, B. & van Beilen, J. B. (2001) Plasmid 46, 16–24). Na primeira etapa o *alkBFG* foi inserido através as interfaces NdeI e Sall no pCOM10, em uma segunda etapa o *alkT* foi clonado através das interfaces PaeI e XhoI.

[000117] O plasmídeo recombinante foi primeiramente transformado na *E. coli* DH5α. Clones portadores de plasmídeo foram selecionados em meio LB contendo canamicina. O plasmídeo então isolado foi controlado por análise de restrição e sequenciamento. Ele leva a denominação pBT10 (Figura 10).

B3. Biotransformação no bioreactor de metiléster de ácido láurico

formando o metiléster de ácido hidroxiláurico e metiléster de ácido 12-oxoláurico

[000118] Para a biotransformação o plasmídeo pBT10 foi transformado por choque térmico a 42°C durante 2 minutos na cepa quimicamente competente E. coli W3110. Para a síntese de metiléster de ácido hidroxiláurico e metiléster de ácido 12-oxoláurico a E. coli W3110-pBT10 foi cultivada durante a noite sob 30°C e 180 rpm em meio M9 e colhida. A biomassa absorvida em meio M9 com 0,5% de glicose até uma OD450 = 0,2. A expressão foi induzida após um intervalo de crescimento de 4 hs com di-ciclopropilcetona e incubada por mais 4 hs. As células foram novamente centrifugadas, o pélete celular resuspenso no tampão KPi (50 mM, pH 7,4) e colocado em um bioreator. Foi ajustada uma concentração de biomassa de aproximadamente 1,8 gCDW/L. Sob intensa agitação (1500 min<sup>-1</sup>) o substrato metiléster de ácido láurico foi adicionado na razão de 1:3 à suspensão celular (100 mL de suspensão celular, 50 mL de metiléster de ácido láurico). A temperatura foi mantida constante a 30°C.

[000119] A formação dos produtos metiléster de ácido hidroxiláurico e metiléster de ácido 12-oxoláurico foi comprovada por análise de GC da formulação de reação. Para tanto, após 0 min como controle negativo (Figura 13) e após 150 minutos (Figura 14) foi retirada uma amostra da fase orgânica da formulação de reação e analisada por meio de GC Thermo Trace GC Ultra). Como coluna serviu uma Varian Inc. FactorFour™ VF-5m, comprimento: 30 m, densidade de filme: 0,25 µm, diâmetro interno: 0,25 mm.

Condições de análise:

Temperatura de estufa	80 – 280 °C
Rampa	15°C/min
Razão de clivagem	15
Volume de injeção	1 µL

Fluxo portador	1,5 mL/min
Injetor PTV	80 – 280°C sob 15°C/s
Temperatura básica de detector:	320 °C

[000120] A detecção de metiléster de ácido 12-oxoláurico (Figura 11) e metiléster de ácido 12-hidroxiláurico (Figura 12) foi mostrada através de injeção das substâncias puras.

C Reação de metiléster de ácido 12-oxoláurico formando metiléster de ácido 12-aminoláurico

C 1: Isolamento e expressão de uma aminotransferase a partir de *Arabidopsis thaliana*

[000121] É analisada uma aminotransferase conhecida de *Arabidopsis thaliana*. Neste caso, a 4-aminobutirato-transaminase (at3g22200, SEQ ID Nº 38) mostrou surpreendentemente uma atividade de aproximadamente 14 U/mg de proteína expressa de forma heteróloga em relação a metiléster de ácido 12-oxododecano. O produto metiléster de ácido 12-aminododecano foi confirmado por HPLC.

[000122] Salvo indicada disposição contrária, todos os métodos foram realizados de acordo com os protocolos em Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T (1989). Molecular cloning, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Isolamento da 4-aminobutiratotransaminase a partir de *A.thaliana* (at3g22200)

[000123] O RNA foi isolado com o mini kit RNeasy de uma planta inteira, florescente do tipo *A. thaliana* conforme instruções do fabricante: QIAGEN GmbH, Hilden.

[000124] Em seguida, a síntese cDNA foi feita com o kit RT Skript USB Europe GmbH, Staufen) conforme instruções do fabricante. A determinação da qualidade/quantidade de RNA foi estabelecida por meio de Nanodrop conforme instruções do fabricante (Thermo Fisher

Scientific Inc. Waltham USA).

PCR de *A. thaliana* cDNA para a introdução de interfaces

[000125] Com os iniciadores a seguir o DNA que codifica a 4-aminobutiratotransaminase foi clonado com a SEQ ID Nº 39 no vetor digerido com NaeI, BamHI.

[000126] O iniciador Forward introduz interfaces Protease e NaeI, SEQ ID Nº 36

GCCGGCGAGAACCTGTACTTTTCAGATGGCAAGTAAGTA  
TGCCACTTG

Reverse-Iniciador introduz BamHI , SEQ ID Nº 37

GGATCCTCACTTCTTGTGCTGAGCCTTG

[000127] O PCR foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:

Formulação	Programa
2 µL cDNA	95 °C 3 min
5 µL 10x Pfu tampão MgSO <sub>4</sub>	94 °C 45 seg
5 µL dNTPs 2 mM	58 °C 1 min } 30 ciclos
2 µL Iniciador forward 10 µM	72 °C 4 min
2 µL Iniciador reverse 10 µM	72 °C 10 min
0,5 µL Pfu	
36,5 µL H <sub>2</sub> O	

[000128] O produto PCR resultante foi purificado com o II kit NucleoSpin® Extract (Macherey-Nagel, Deutschland, conforme instruções do fabricante).

Expressão da proteína heteróloga

[000129] Sob uso do produto PCR acima descrito o vetor pGJ3130 (Figura 15, SEQ ID Nº 43) foi fabricado através de métodos de biologia molecular convencionais e transformado na *E.coli* XL1blue. A cepa *E. coli* foi cultivada em meio YT duplicado (dYT) com o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) e sob adição de 0,5 mM IPTG a 28 °C até uma densidade de OD<sub>600 nm</sub>=0,3-0,4.

Purificação de proteína expressa de forma heteróloga por 6xHis-Tag

[000130] Lise da cultura de expressão em bactéria: 50 mL de cultura foram centrifugados em 2360 x g, e em seguida resuspenso em 5 mL de tampão de fosfato de sódio (pH 8) com 5 mM de EDTA, 300 mM de NaCl e 1 mg/mL de lisozima, incubados por 1h sob temperatura ambiente. O lisato foi centrifugado em 2360 x g por 10 minutos e o excedente foi purificado através de uma coluna do tipo Protino Ni-TED 2000 Packed Column (conforme instruções do fabricante; Macherey-Nagel, Düren). A concentração de proteína foi determinada por meio de Bradford.

Comprovação de atividade enzimática através de um ensaio acoplado

[000131] A atividade foi determinada em um ensaio acoplado, no qual o piruvato que precipita como produto secundário da reação de transaminase em uma segunda etapa continua sendo reagido, sendo que NADH é oxidado formando NAD<sup>+</sup>. A diminuição da concentração de NADH (Princípio: medição da queda de extinção) é medida no fotômetro em 340 nm e serve como medida da atividade.

Preparação	
50 mM	fosfato de sódio pH 7,5
50 mM	L-alanina
100 µM	piridoxalfosfato
250 µg	metiléster de ácido 12-oxododecano
1,25 mM	NADH
10 U	lactatodesidrogenase
10 µg	proteína expressa de forma heteróloga
Preencher com H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> até 1 mL	

[000132] O ensaio foi iniciado mediante adição de 5 µL de 12-ODME (50 mg/mL). A medição é feita continuamente a cada minuto em 340

nm sob temperatura ambiente até no máximo 20 minutos.

[000133] Para o controle foi empregada proteína inativada e uma formulação sem co-substrato.

[000134] Na Figura 16 a alteração de extinção pode ser feita no fotômetro

#### Comprovação da proteína expressa de forma heteróloga através de HPLC

Formulação	
50 mM	fosfato de sódio pH 7,5
50 mM	L-alanina
100 µM	piridoxalfosfato
250 µg	metiléster de ácido 12-oxododecano
50 µg	proteína expressa de forma heteróloga
Preencher com H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> até 500 µL	

[000135] Após incubação por 4hs sob temperatura ambiente a reação foi paralizada com 1 Vol. de MeOH

[000136] Para a análise por HPLC a formulação foi derivatizada com o-ftaldialdeído (oPA) e dela 250 µL analisados. Como eluente A foi empregado 50 mM de NaAC pH 4:acetonitrila 4:1 (v:v).

[000137] O eluente B era acetonitrila com 5 % de 50 mM de NaAC pH 4. O gradiente passou de 30 % B para 60 % B em 4 minutos, de 60% B para 100% B e 2 minutos. Taxa de fluxo foi de 1,2 mL/min. A separação foi feita através de uma coluna Agilent Zorbax RP18 (Agilent Technologies, USA), A temperatura de coluna foi de 40 °C. A Figura 17 (acima) mostra a formação de metiléster de ácido 12-aminoláurico. A amostra de referência aparece representada abaixo na Figura 17.

#### D Aminação de metiléster de ácido 12-oxoláurico com PPTA5 e PSTA da Pseudomonas

##### D1. Clonagem de PPTA5 e PSTA

[000138] Para a aminação de metiléster de ácido 12-oxoláurico foram utilizadas as cepas *E. coli* BL21(DE3)/PPTA5 e *E. coli* BL21(DE3)/PSTA. Essas cepas foram construídas como segue. Para a clonagem de ambos os genes de transaminase foi escolhido o vetor de expressão pET-21a(+) (Novagen). Para o gene ppta5, SEQ ID N° 40, foram construídos iniciadores, que devem inserir no gene nas extremidades;

[000139] Iniciador PPTA5\_NdeI:

GGAATTCCATATGAGCGTCAACAACCCGCAAACCCG (SEQ ID N° 44) e

[000140] Iniciador PPTA5\_XhoI:

CCGCTCGAGTTATCGAATCGCCTCAAGGGTCAGGTCC (SEQ ID N° 45).

[000141] Para o gene psta-Gen, SEQ ID N° 41, Iniciador com NdeI e BamHI nas extremidades; Iniciador PSTA\_NdeI:

GGAATTCCATATGAGCGA TTCGCAAACCCTGCACTGGC (SEQ ID N° 46) e Iniciador PSTA\_BamHI:

CGCGGATCCTCAGCCCAGCACATCCTTGGCTGTCTG (SEQ ID N° 47.)

[000142] Esses iniciadores foram utilizados em PCRs. Os produtos PCR purificados assim como o vetor pET-21a(+) foram em seguida submetidos a uma restrição com as enzimas de restrição NdeI e XhoI ou NdeI e BamHI. O vetor cortado foi defosforilado com fosfatase alcalina de camarões. Vetor cortado com NdeI e XhoI e gene ppta5 assim como vetor cortado com NdeI e BamHI e gene psta foram transformados após ligação com T4 DNA Ligase com a cepa de expressão competente *E. coli* XL1-Blue. Após propagação de um clone foi feito o isolamento dos plasmídeos com restrição em seguida e análise por eletroforese em gel. As sequências de transaminase dos clones obtidos (pPPTA5 ou pPSTA) foram confirmadas por análise de

sequência. A Figura 18 mostra os mapas de plasmídeo dos vetores de expressão.

## D2. Expressão de PPTA5 e PSTA

[000143] Para a expressão, os vetores pPPTA5 e pPSTA foram transformados em células *E. coli* BL21(DE3) competentes. Cada colônia individual foi inoculada em 5 mL de meio LB-Amp (concentração de ampicilina 100µg/mL) e agitada durante a noite sob 37°C. Em seguida, a 1 % foi inoculado em 200 mL do meio LB-Amp, agitado sob 37°C e após atingir um OD<sub>600</sub> de 0,5 com 0,5 mM de IPTG a expressão gênica foi induzida. Após agitação de 20 horas sob 30°C as células foram colhidas e armazenadas sob -20°C.

[000144] Para a desintegração das cepas *E. coli* BL21(DE3)/pPPTA5 e *E. coli* BL21(DE3)/pPSTA foram processados 0,4 g de células com 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,2 formando suspensões celulares a 25 %, que foram tratadas com ultrassom por duas vezes durante 90 segundos (Bandelin Sonoplus HD2070; Sonda MS73; 50 % de intensidade). Após a centrifugação os excedentes foram removidos. Os extratos brutos assim obtidos foram utilizados em reações de metiléster de ácido 12-oxoláurico. As formulações de 400 µL continham 5 mM de metiléster de ácido 12-oxoláurico, dissolvidos em N,N-dimetilformamida, 500 mM de DL-alanina, 1 mM de piridoxal-5'-fosfato e 80 µL de extrato bruto em 10 mM de tampão Kpi pH 7,0. Foi feita agitação sob 25°C. Após determinados intervalos foram retirados 20 µL de amostras, uma parte colocada com 1 µL de solução de NaOH a 1% nas faixas de pH alcalinas e agitada com 100 µL de metiléster de ácido acético. As fases orgânicas foram analisadas por cromatografia a gás (Gaschromatograph Fa. Perkin Elmer, Clarus 500 com detector de ionização a chamas). Neste caso foi empregada uma coluna Optima 5 (0,25 µm, 30 m, 0,25 mm, Macherey-Nagel) com programa:

80°C

25°C/min	180°C
5°C/min	215°C
20°C/min	280°C

[000145] Os tempos de retenção de metiléster de ácido 12-oxo- e 12-aminoláurico situam-se em 7,2 ou 7,7 minutos.

[000146] Os resultados das reações aparecem ilustrados nas Figuras 20 e 21. Para a análise foram somadas as superfícies de pico de etiléster de ácido 12-Oxo- e 12-aminoláurico a partir dos cromatogramas obtidos da extração neutra e ácida e calculada a porcentagem de extrato ou produto.

## REIVINDICAÇÕES

1. Bactéria, caracterizada pelo fato de que é geneticamente modificado em relação ao seu tipo selvagem, em que é apto para fabricar mais ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, mais ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou mais lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos a partir de ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico, em que o micrororganismo apresenta uma atividade aumentada em relação ao seu tipo selvagem das enzimas E<sub>I</sub> e E<sub>III</sub>, ou das enzimas E<sub>I</sub>, E<sub>II</sub>, e E<sub>III</sub>, em que:

(i) uma enzima E<sub>I</sub>, que catalisa a conversão de ácidos carboxílicos ou ésteres de ácido carboxílico nos ácidos  $\omega$ -hidroxicarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -hidroxicarboxílico correspondentes,

em que a enzima E<sub>I</sub> é uma alcano monooxygenase codificada por *alkBGT* de *Pseudomonas putida* GPo1 e uma monooxygenase do citocromo P450 de *Candida tropicalis*;

(ii) uma enzima E<sub>II</sub>, que catalisa a conversão de ácidos  $\omega$ -hidroxicarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -hidroxicarboxílicos nos ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -oxocarboxílico correspondentes, sendo que a enzima E<sub>II</sub> é codificada pelo gene *alkJ* de *Pseudomonas putida* GPo1, ou

(iii) uma enzima E<sub>III</sub>, que é a  $\omega$ -transaminase CV2025 de *Chromobacterium violaceum* DSM30191 e catalisa a conversão de ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -oxocarboxílicos nos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos ou ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos correspondentes,

sendo que a bactéria é *Escherichia coli* geneticamente modificada, *Corynebacterium glutamicum* geneticamente modificada ou *Pseudomonas putida* geneticamente modificada.

2. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada

pelo fato de que a expressão de uma enzima  $E_{IV}$ , que é a lipase LipA (Q76D26) de *Pseudomonas fluorescens* e que é secretada pela célula, e catalisa a conversão de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico nos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos correspondentes, é aumentada no micro-organismo.

3. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a expressão de uma enzima  $E_V$ , a qual catalisa a conversão de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos nas lactamas correspondentes, é aumentada no micro-organismo.

4. Bactéria, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a enzima  $E_V$  é secretada pelo micro-organismo.

5. Método para a fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, de ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou de lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, caracterizado pelo fato de que contém as seguintes etapas:

(I) contatar uma bactéria, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, com um meio de cultura contendo um ácido carboxílico ou um éster de ácido carboxílico ou com um meio de cultura contíguo a uma fase orgânica contendo um ácido carboxílico ou um éster de ácido carboxílico sob condições que possibilitam ao micro-organismo formar ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, a partir de ácido carboxílico ou de ésteres de ácido carboxílico;

(II) opcionalmente, isolar os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos formados, os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos formados ou as lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico formados na etapa (I) são convertidos em uma outra etapa de processo através de

métodos químicos convencionais em ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura utilizado na etapa (I) contém aminoácidos, que funcionam como doadores de amino na conversão catalizada pela transaminase dos ácidos  $\omega$ -oxocarboxílicos ou dos ésteres  $\omega$ -oxocarboxílicos nos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos correspondentes ou ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fato de que é realizado em um sistema bifásico, contendo

(A) uma fase aquosa, e

(B) uma fase orgânica,

em que a formação dos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, dos ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou das lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos feita pelos micro-organismos na etapa (I) ocorre na fase aquosa e os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos resultantes, os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílicos resultantes ou as lactamas resultantes derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos se acumulam na fase orgânica.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que o isolamento dos ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos resultantes, dos ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico resultantes ou das lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos ocorre através de pelo menos um processo de purificação bifásico, compreendendo

(a) uma etapa de extração, na qual os ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, os ésteres de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou as lactamas derivadas de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos são extraídos do meio de cultura, e

(b) uma etapa de purificação fina, na qual o extrato obtido na etapa (a) é ainda mais purificado através de processos de destilação ou processos adicionais de extração, obtendo uma fase de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico, uma fase de éster de ácido  $\omega$ -aminocarboxílico ou uma fase de lactama com uma pureza de pelo menos 99,8 %.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a extração na etapa (a) é uma extração reativa.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizado pelo fato de que o ácido carboxílico é um ácido láurico ou o éster de ácido carboxílico é metil laurato e que o ácido láurico ou o metil laurato é convertido na etapa (II) em laurinelactama.

12. Método para a fabricação de poliamidas a base de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

( $\alpha$ 1) fabricação de ácidos  $\omega$ -aminocarboxílicos através de um método, como definido em uma das reivindicações de 5 a 11;

( $\alpha$ 2) polimerização do ácido  $\omega$ -aminocarboxílico, obtendo uma poliamida.

13. Método para a fabricação de poliamidas a base de lactamas, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

( $\beta$ 1) fabricação de lactamas através de um método, como definido em uma das reivindicações de 5 a 11;

( $\beta$ 2) polimerização por abertura de anel ou policondensação da lactama, obtendo uma poliamida.

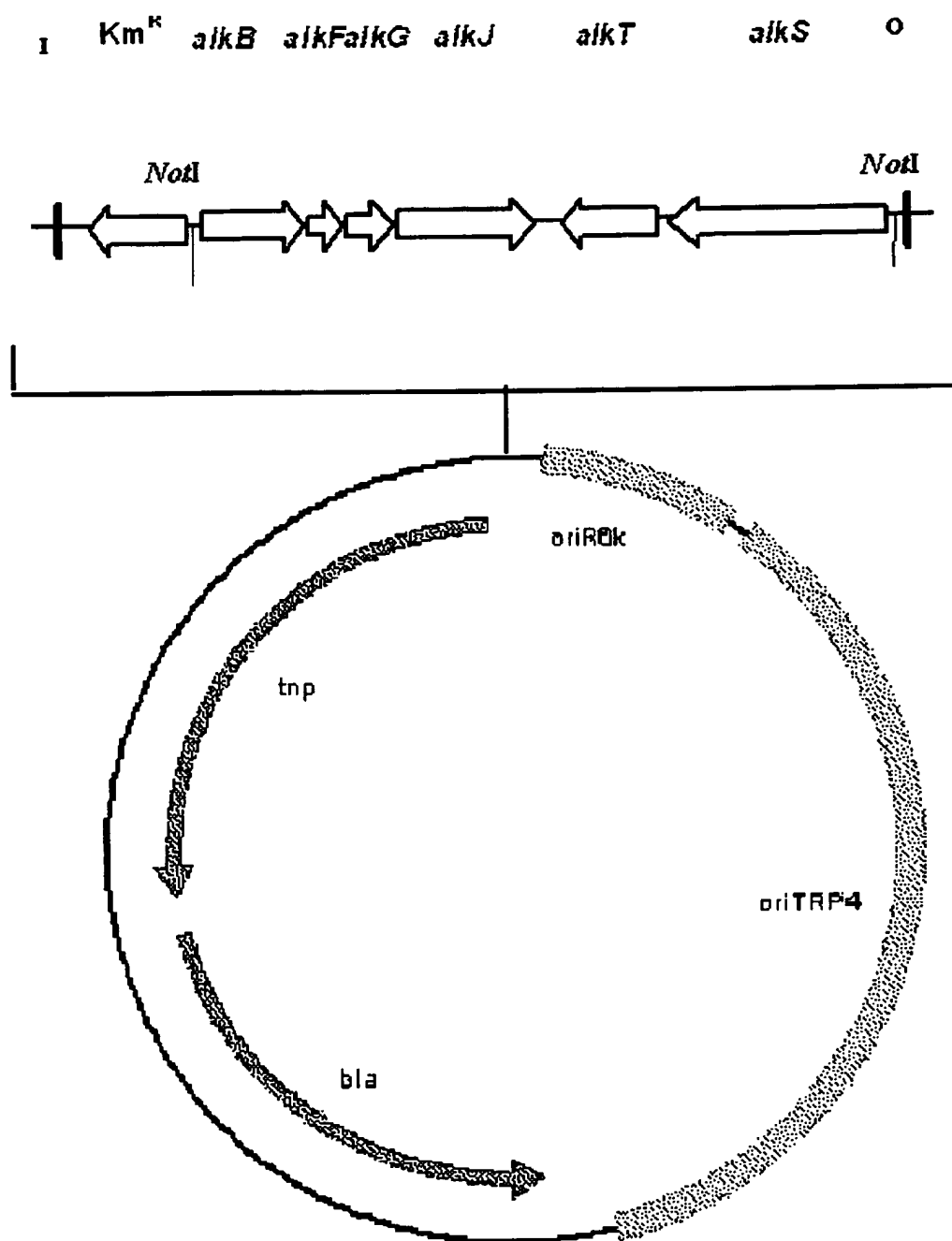


FIG. 1

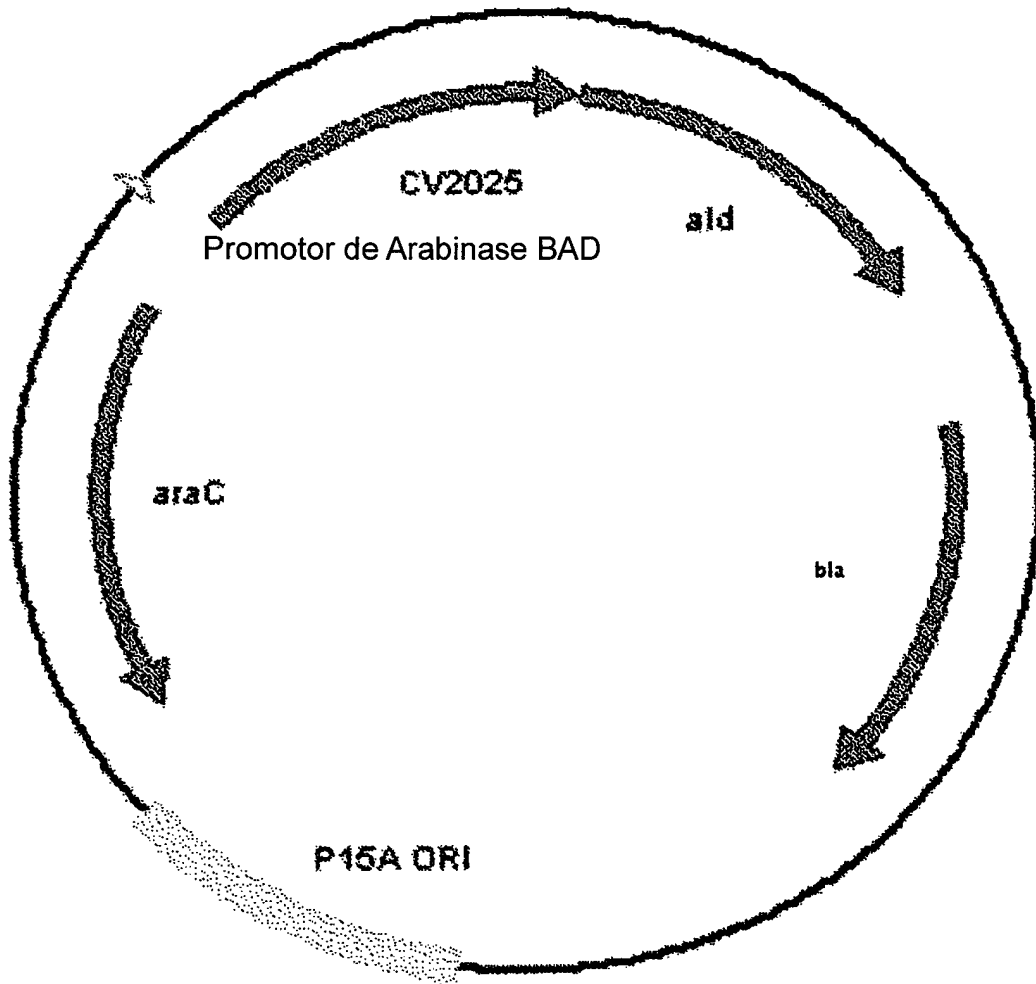


FIG. 2

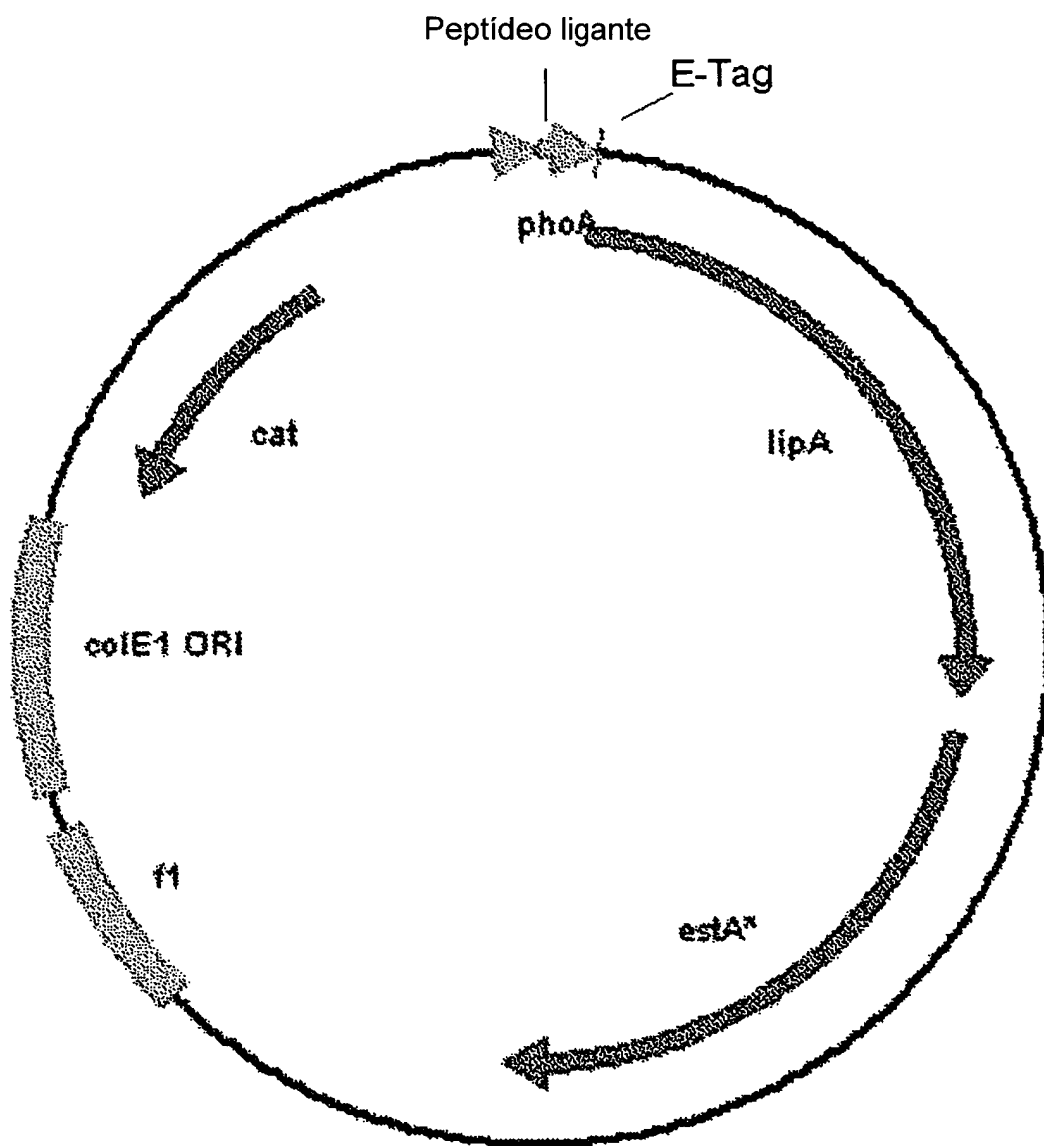


FIG. 3

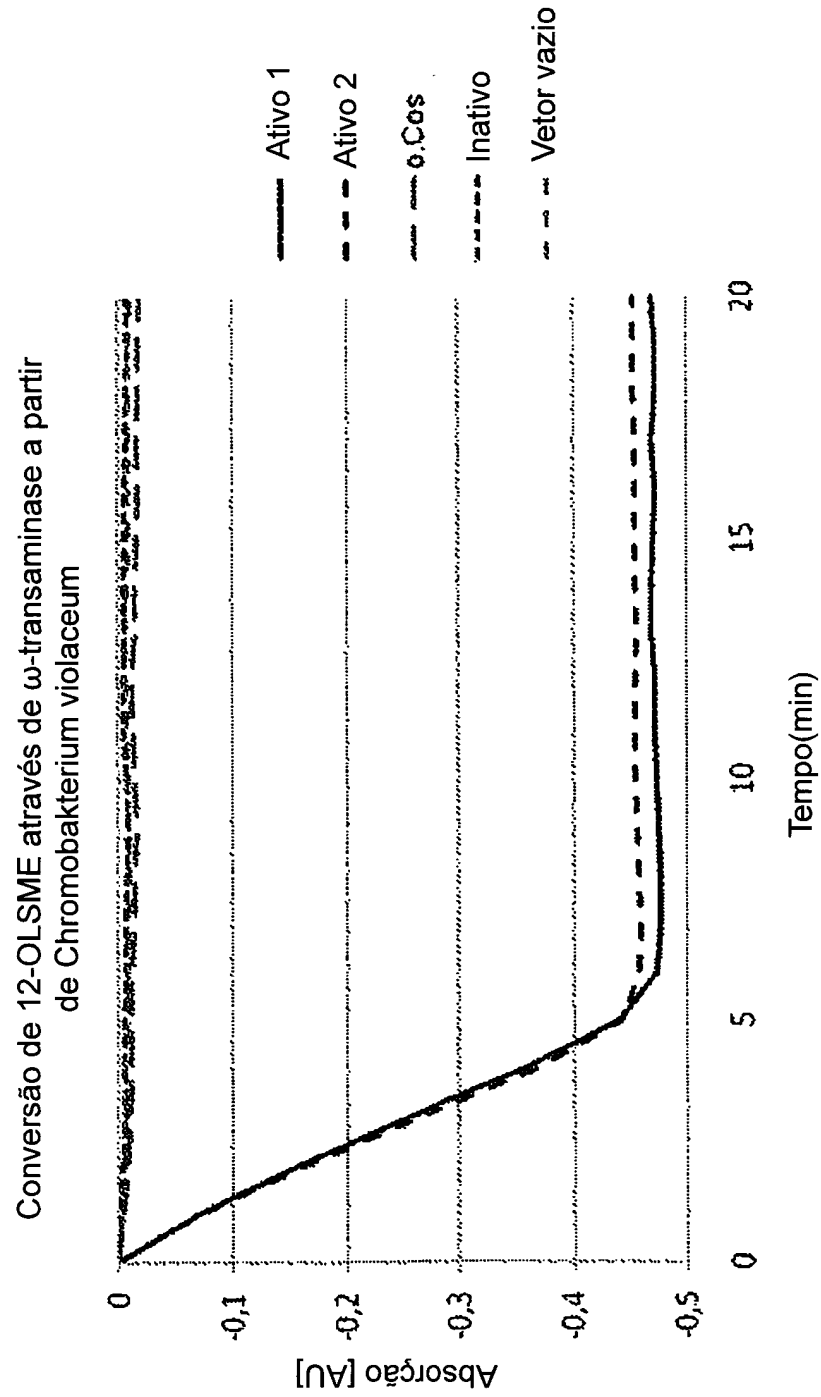


FIG. 4

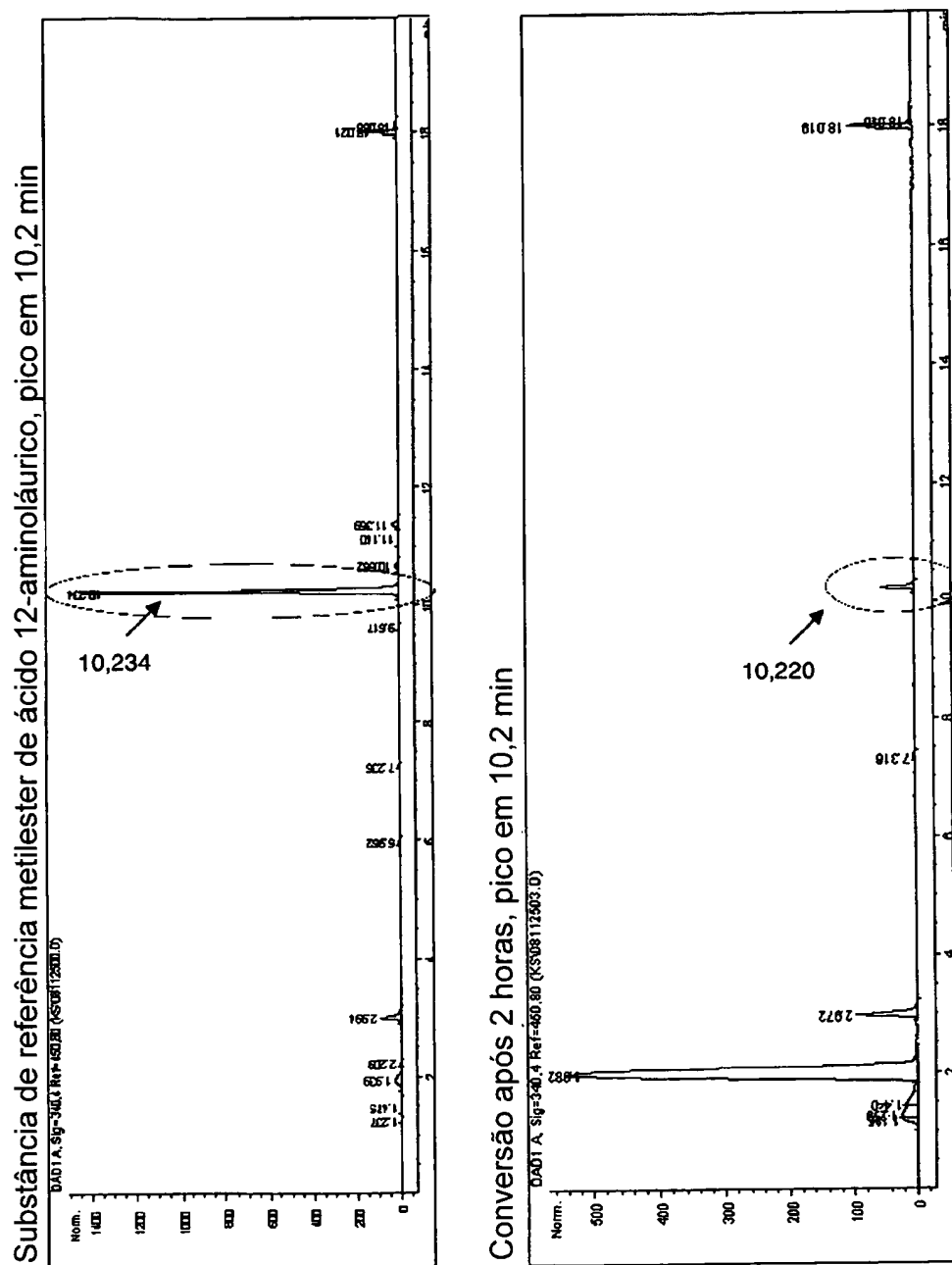


FIG. 5

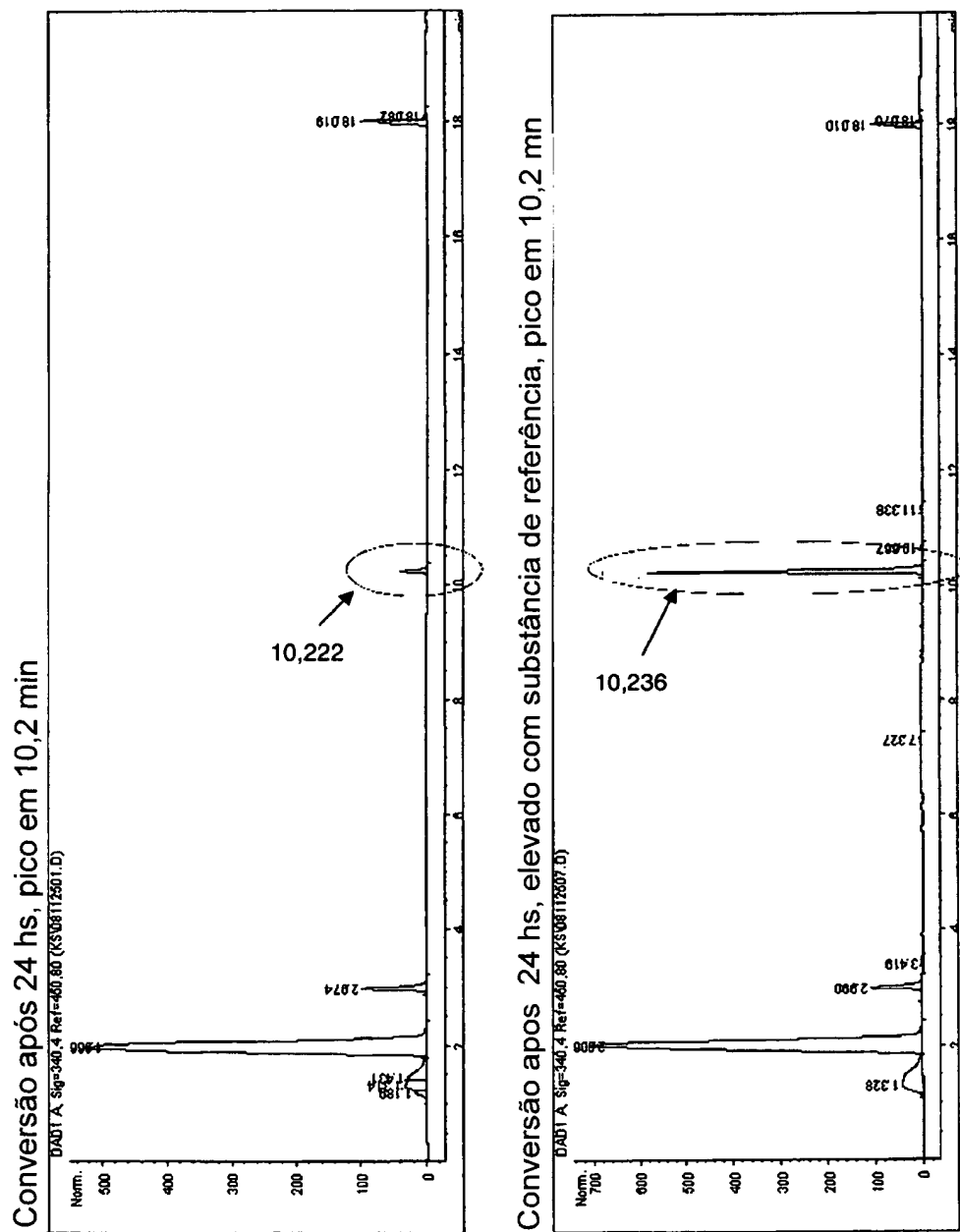
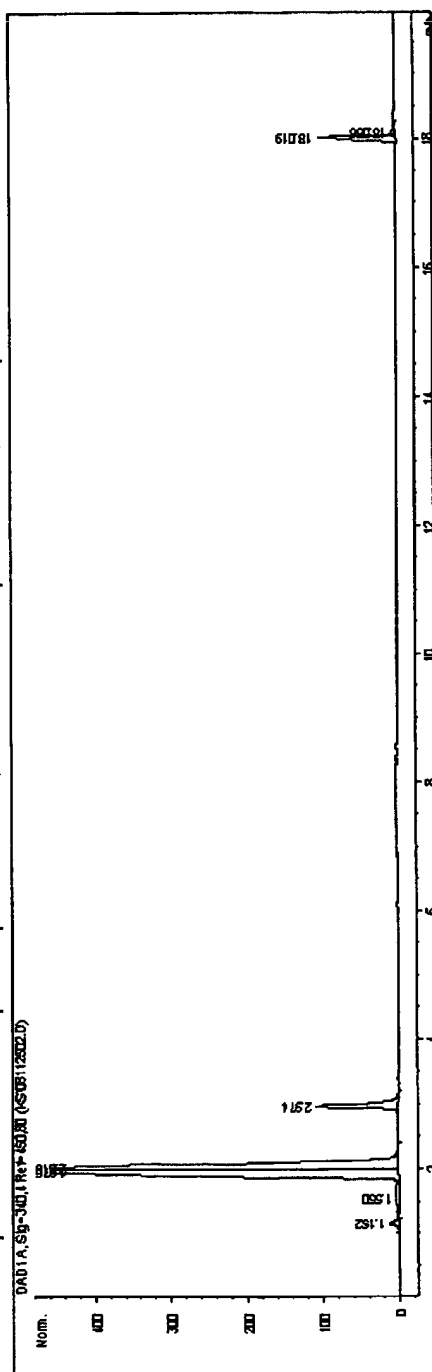


FIG. 6

Controle: proteína inativa por aquecimento, conversão após 24 hs, sem produto demonstrável



Controle: conversão após 0 h, sem produto demonstrável

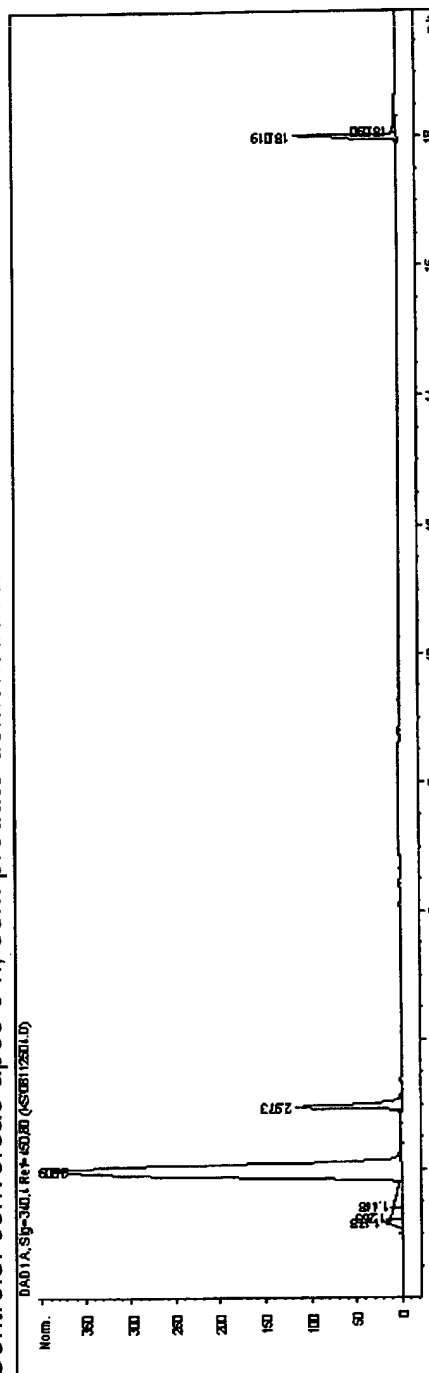


FIG. 7

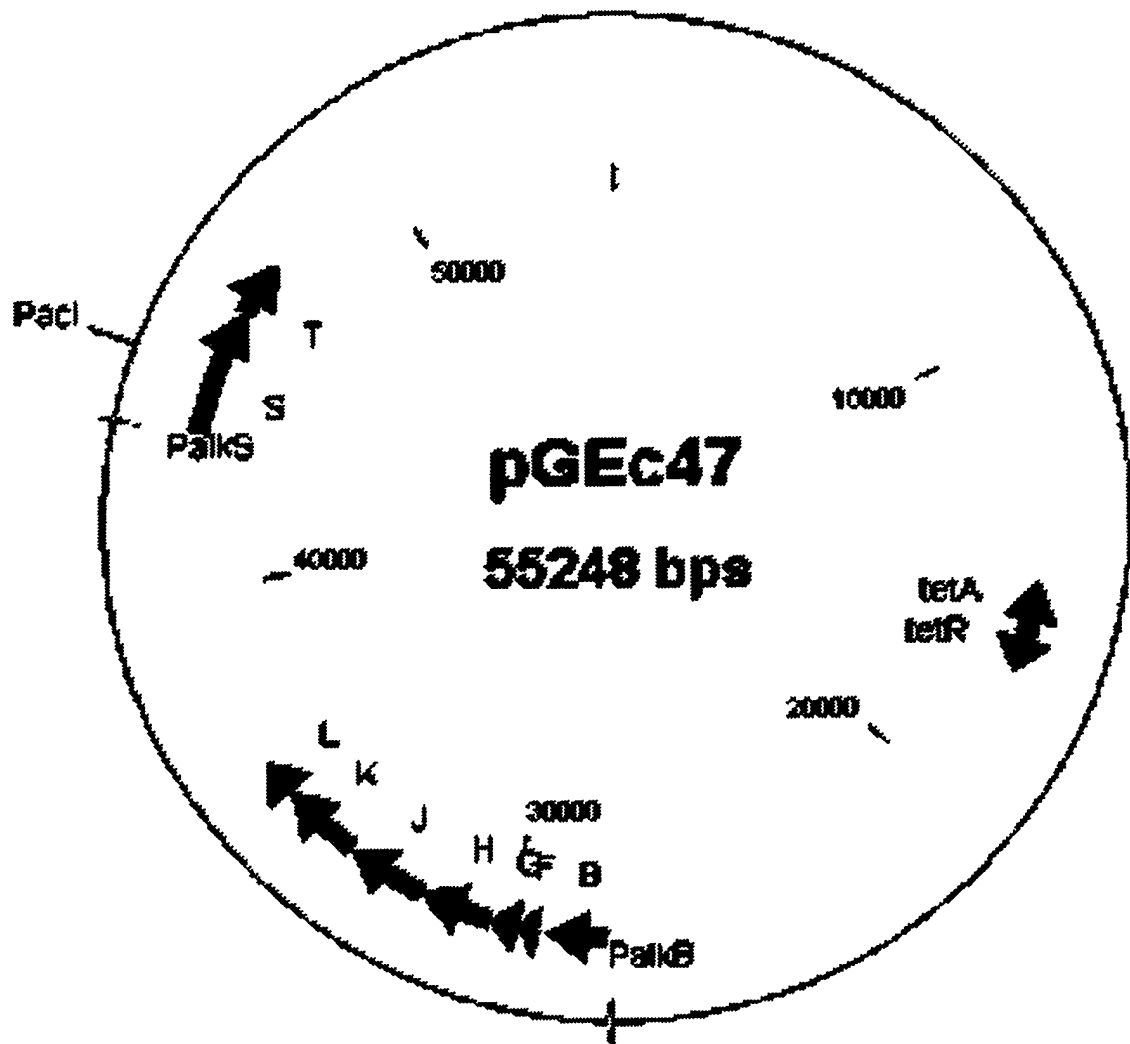


FIG. 8

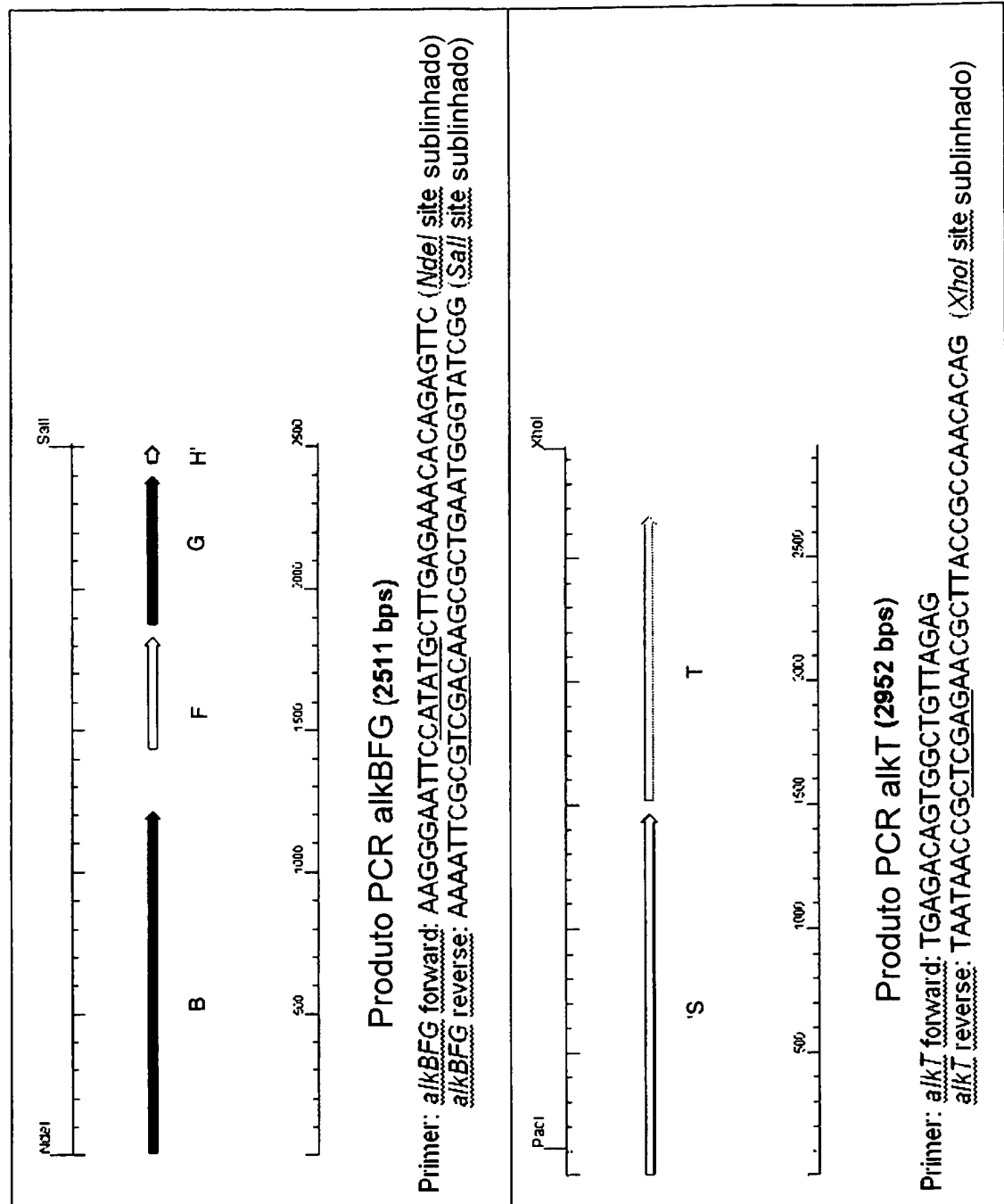


FIG. 9

10/21

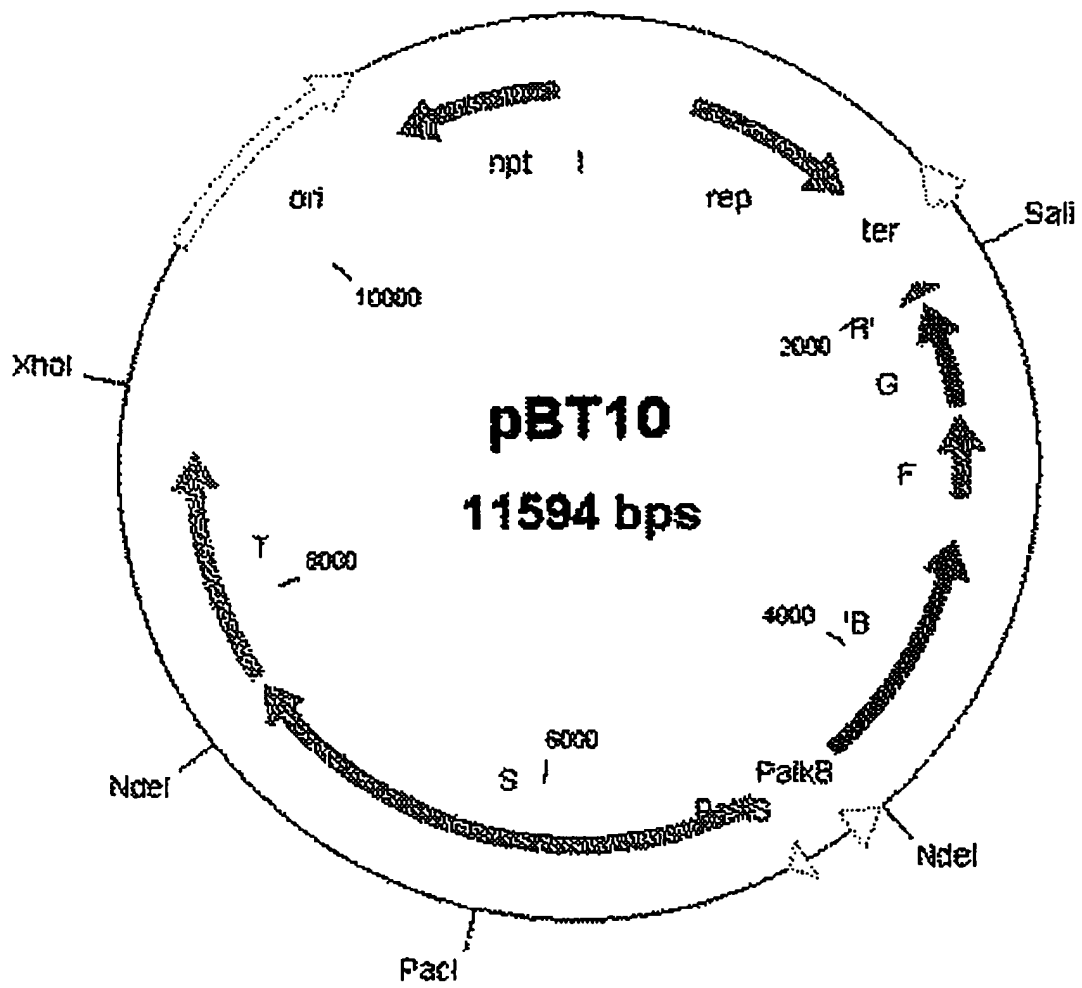


FIG. 10

11/21

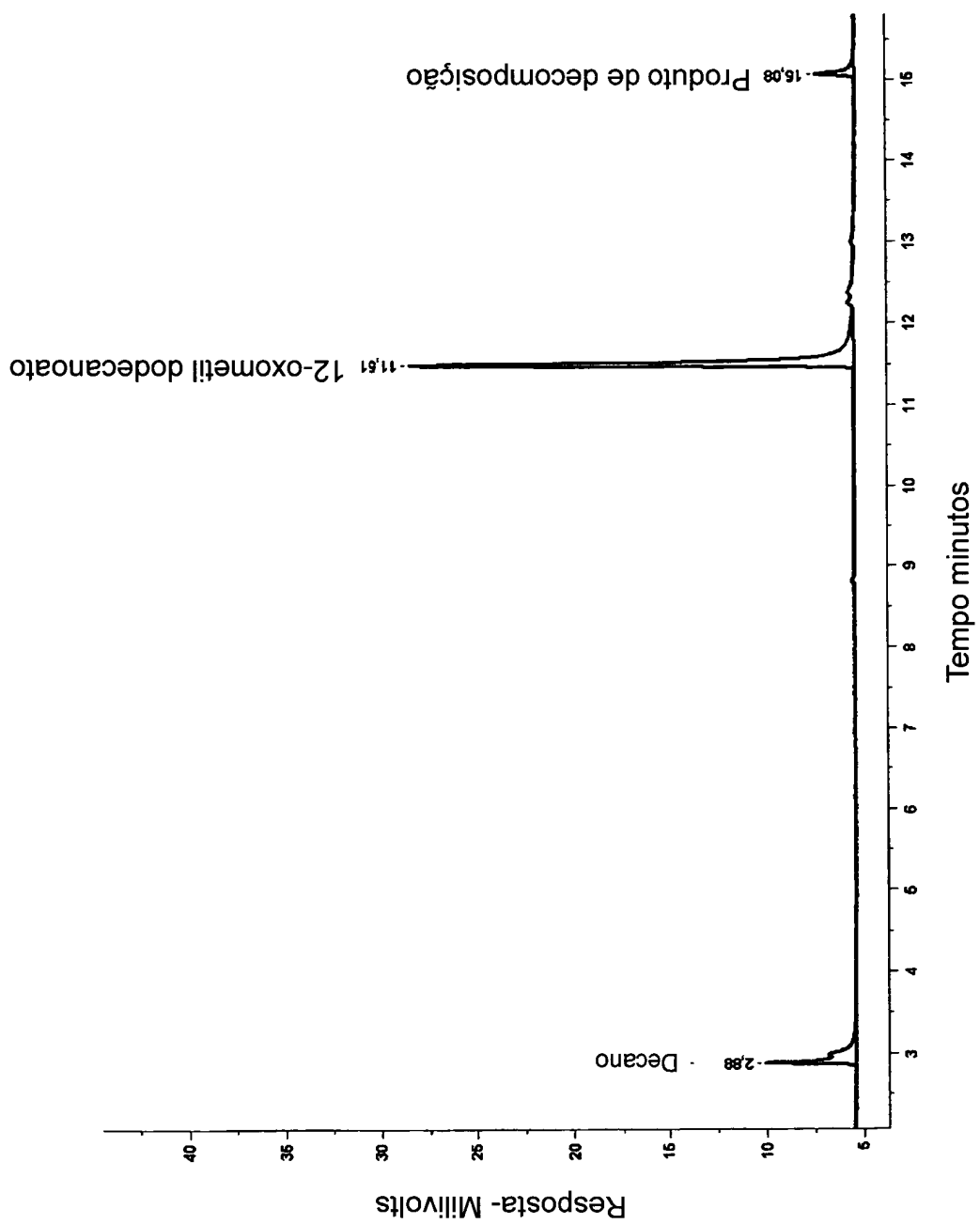


FIG. 11

12/21

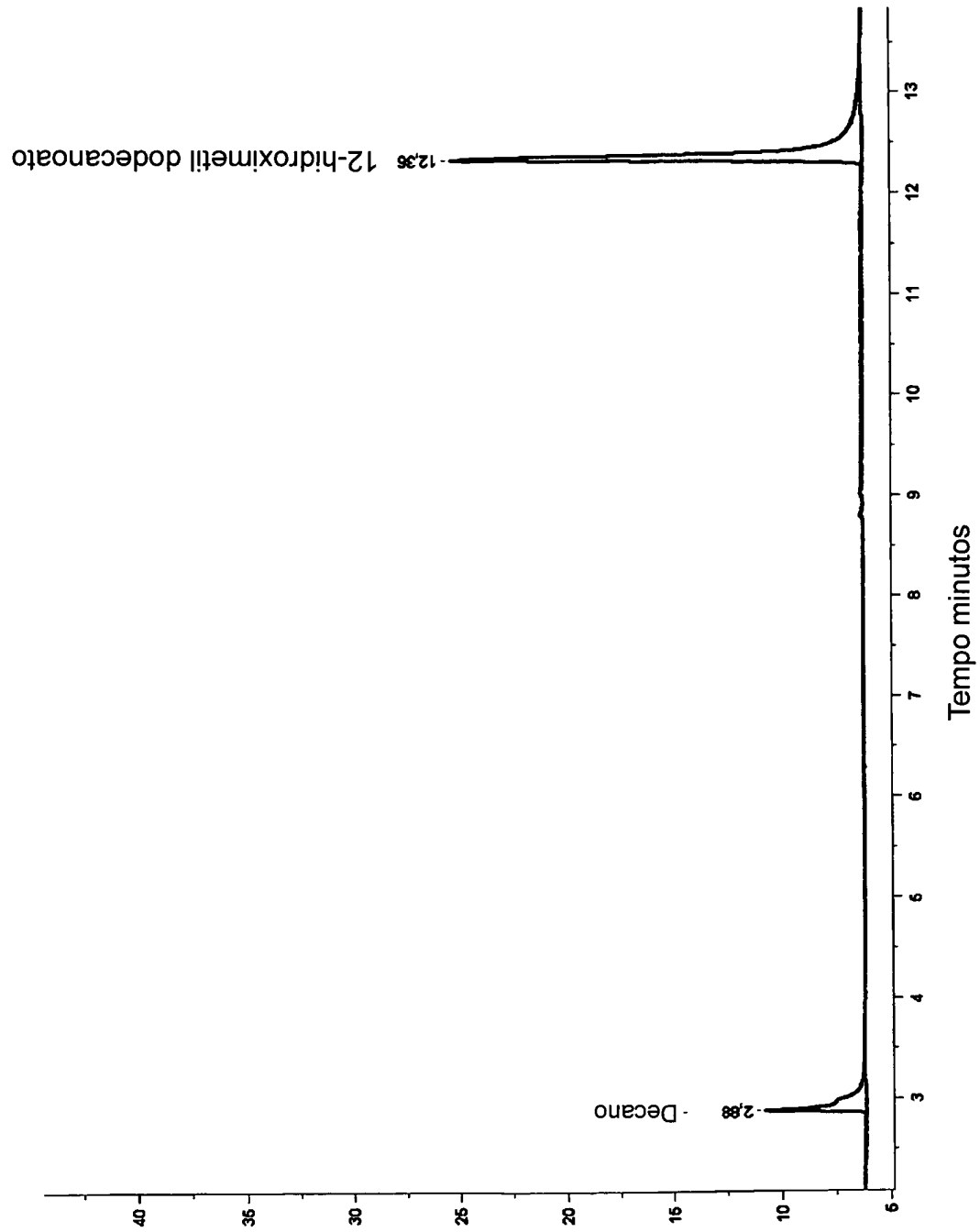


FIG. 12

13/21

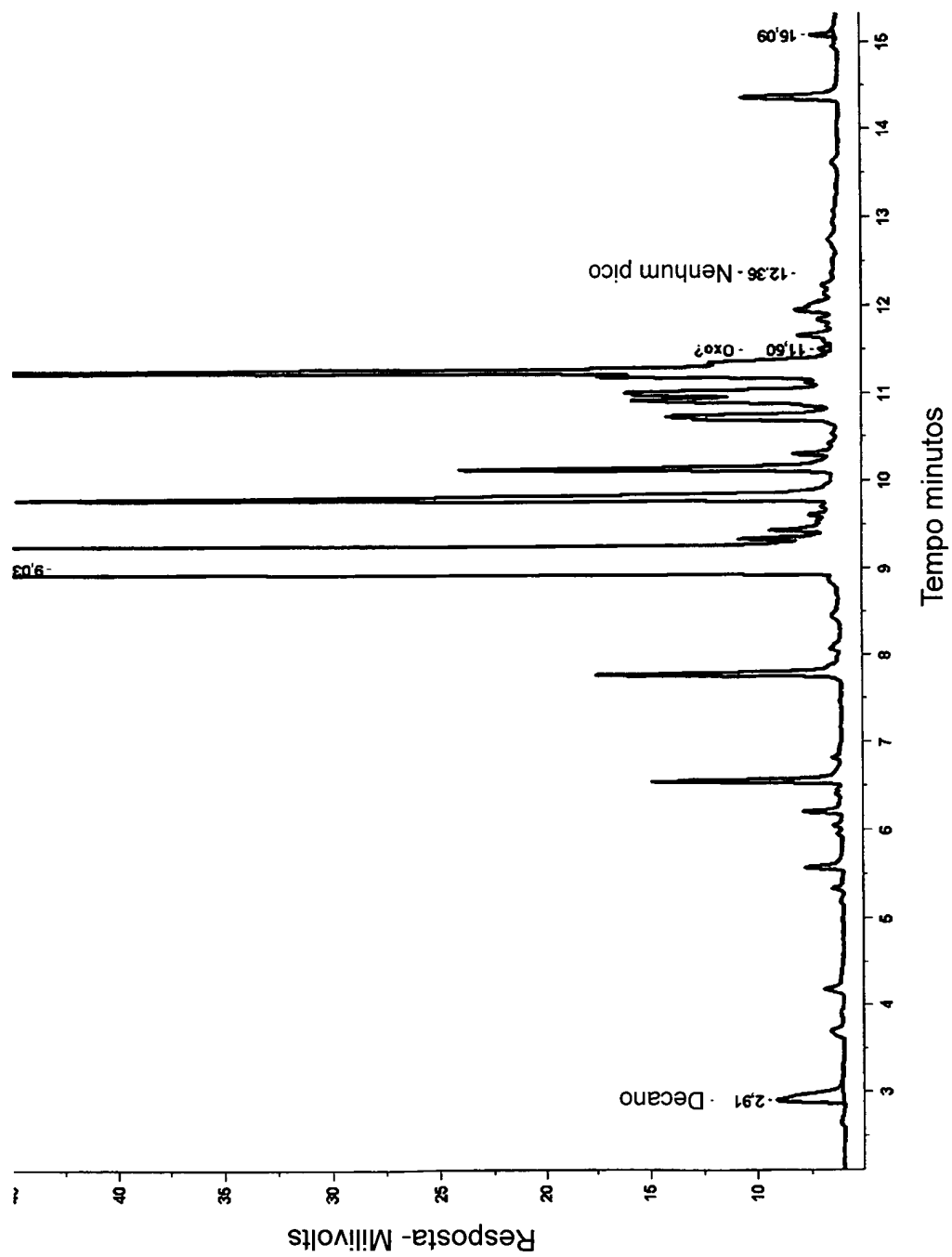


FIG. 13

14/21

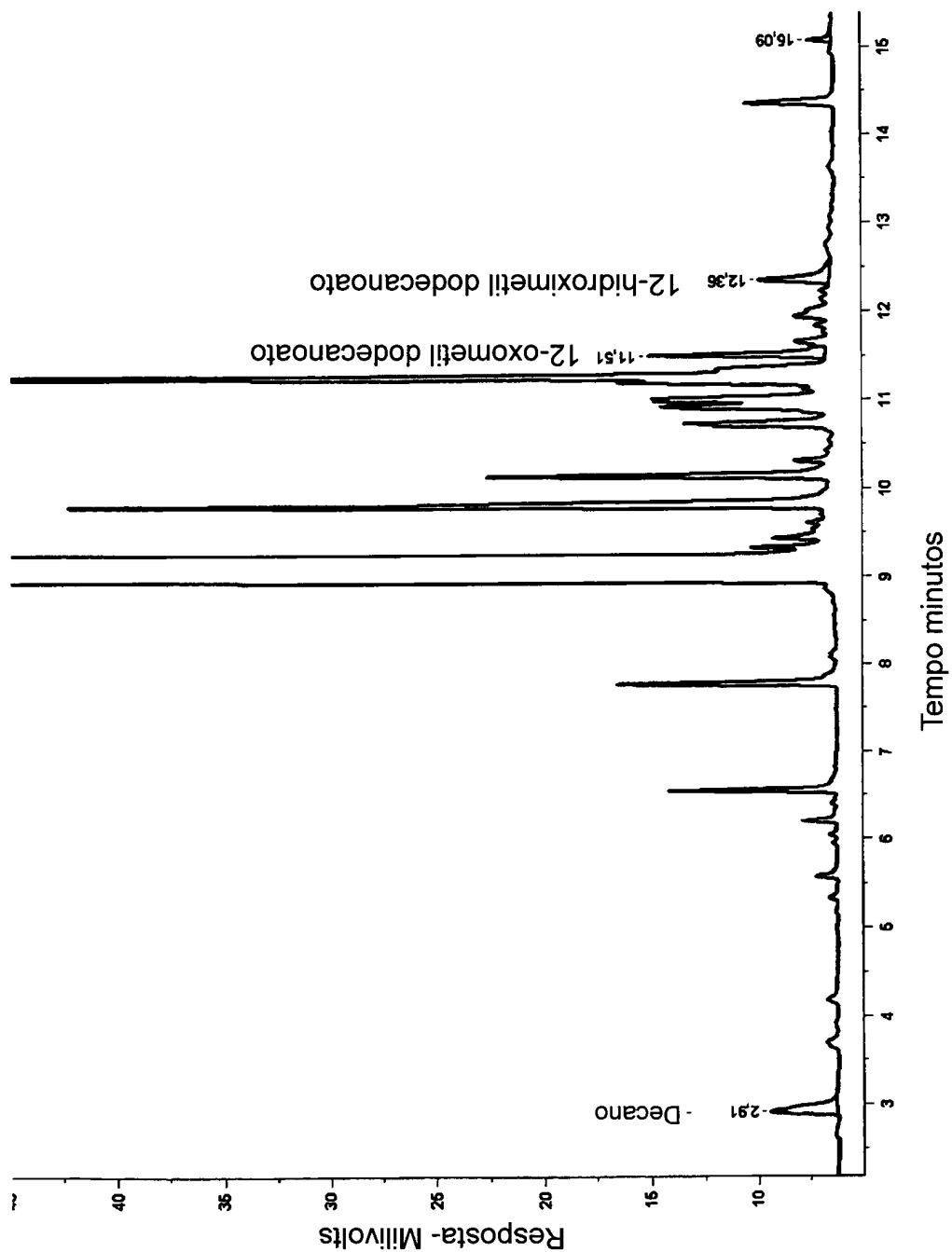


FIG. 14

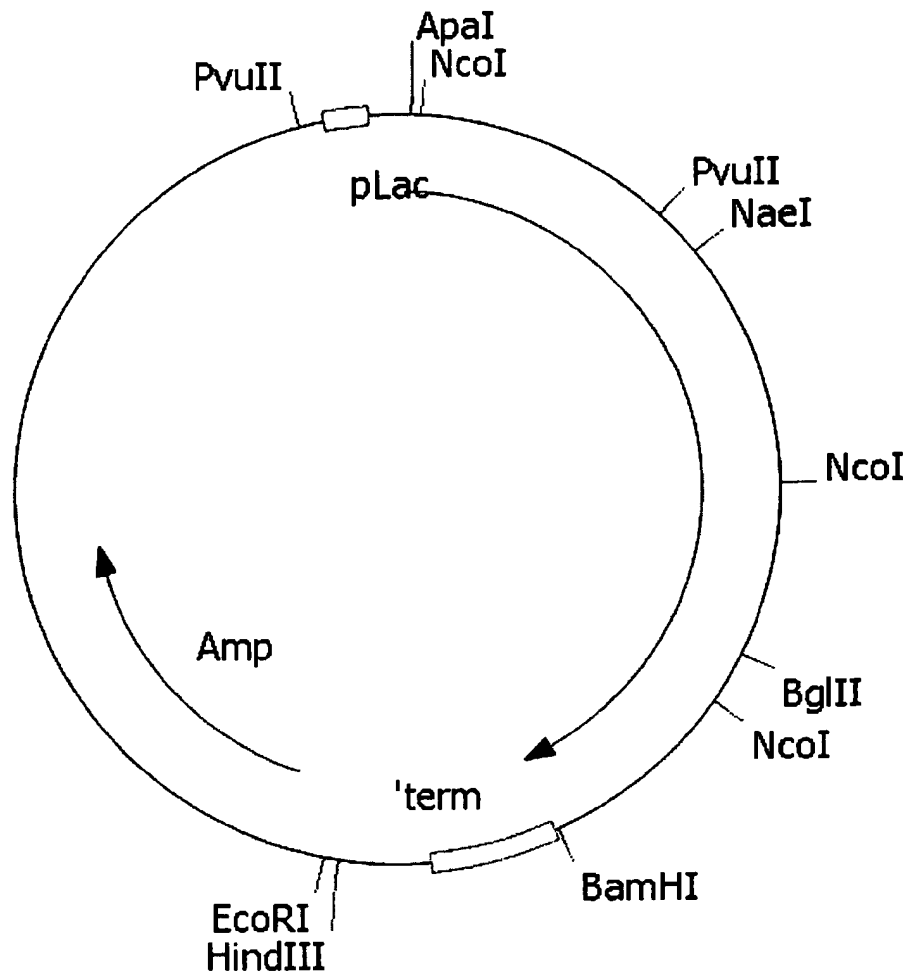


FIG. 15

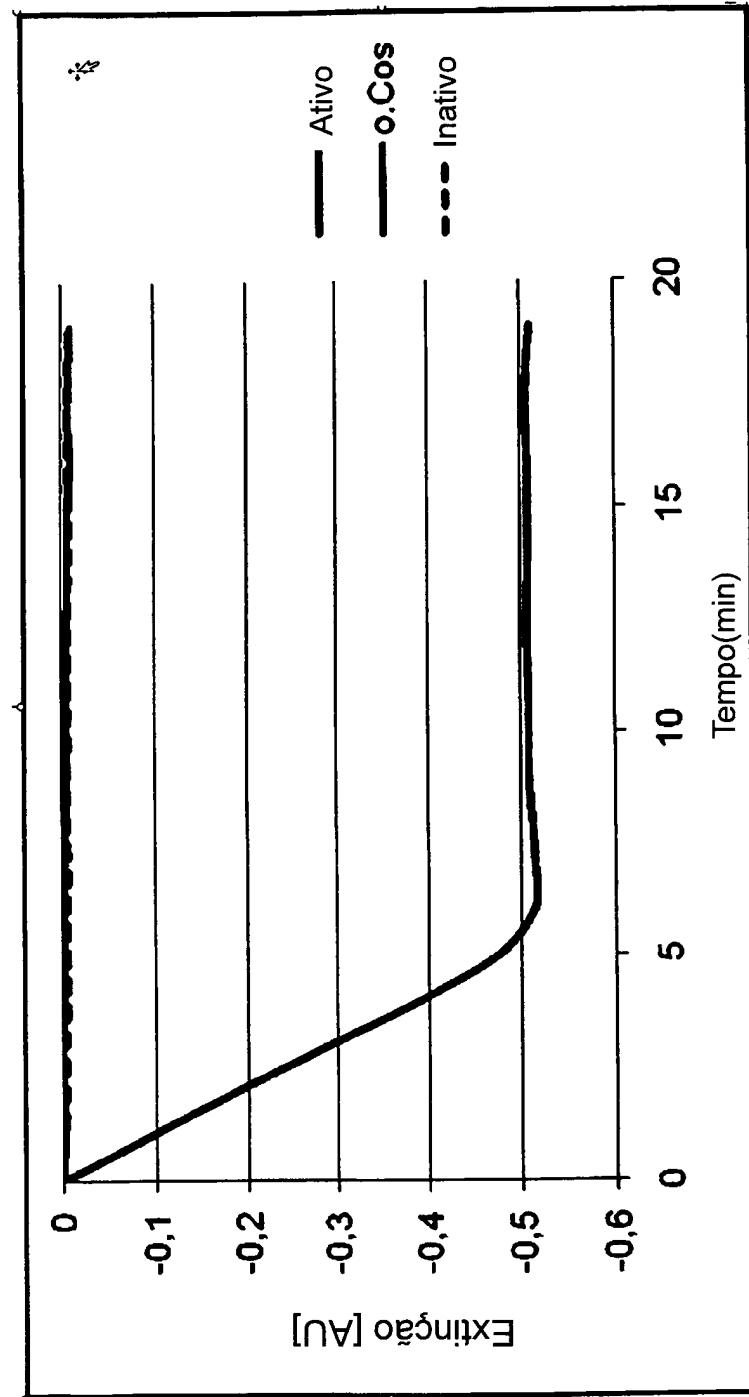


FIG. 16

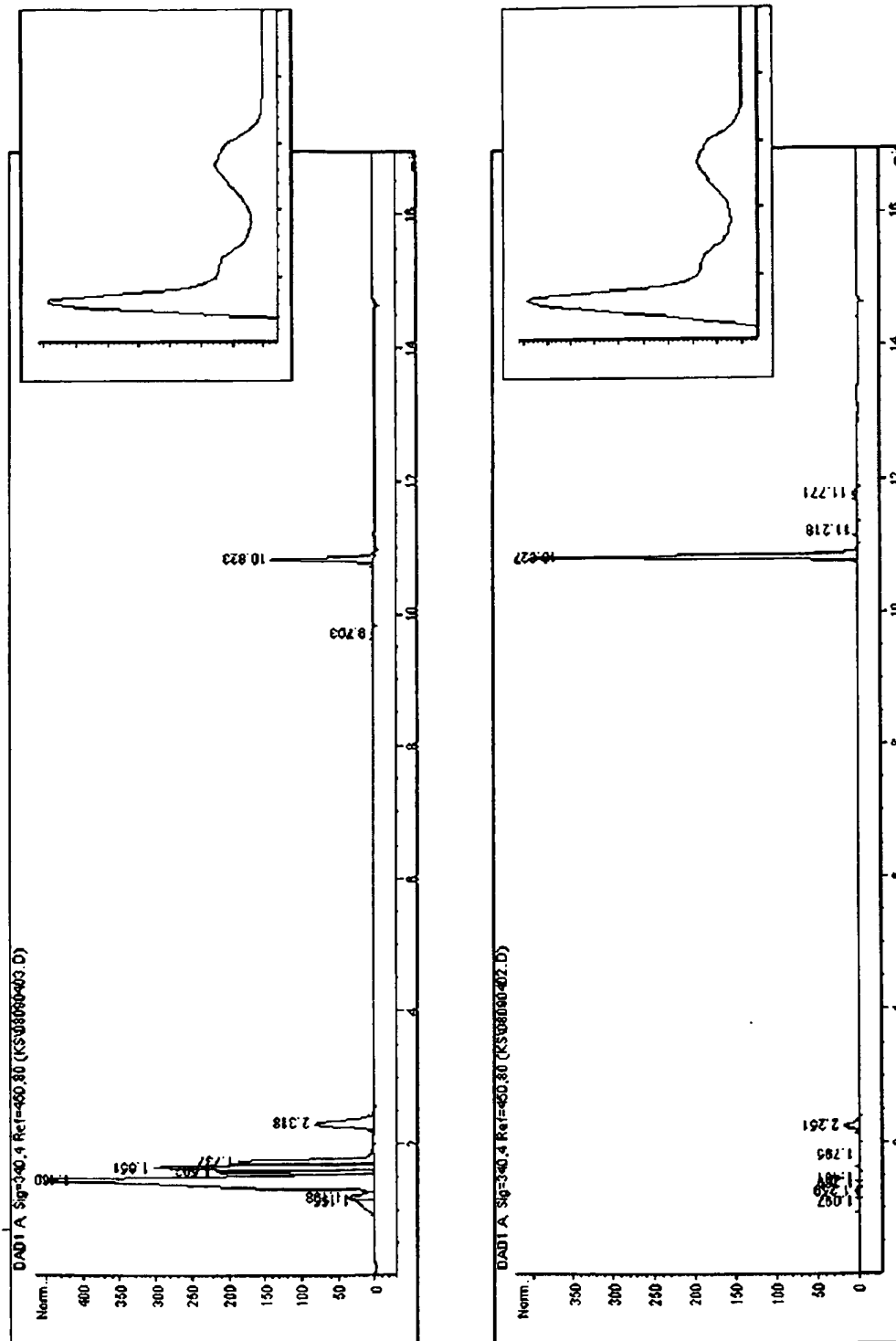


FIG. 17

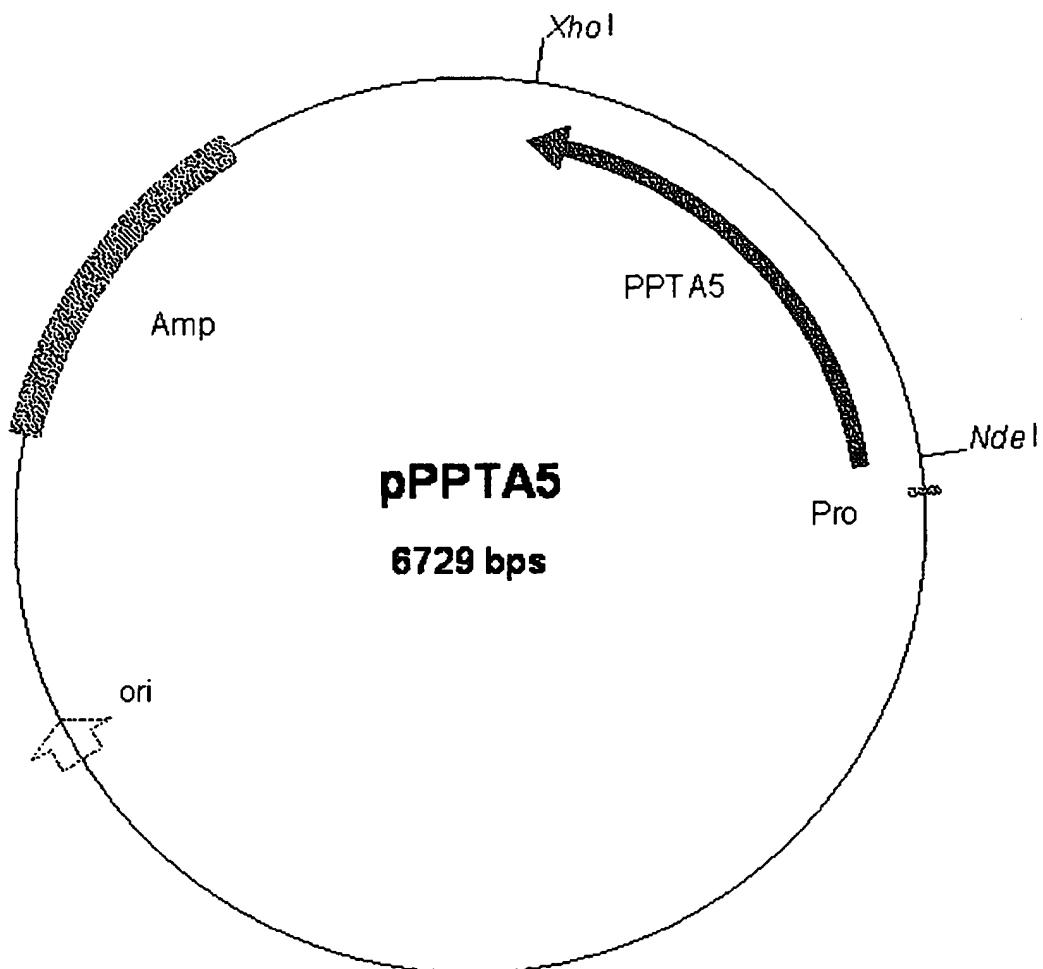


FIG. 18

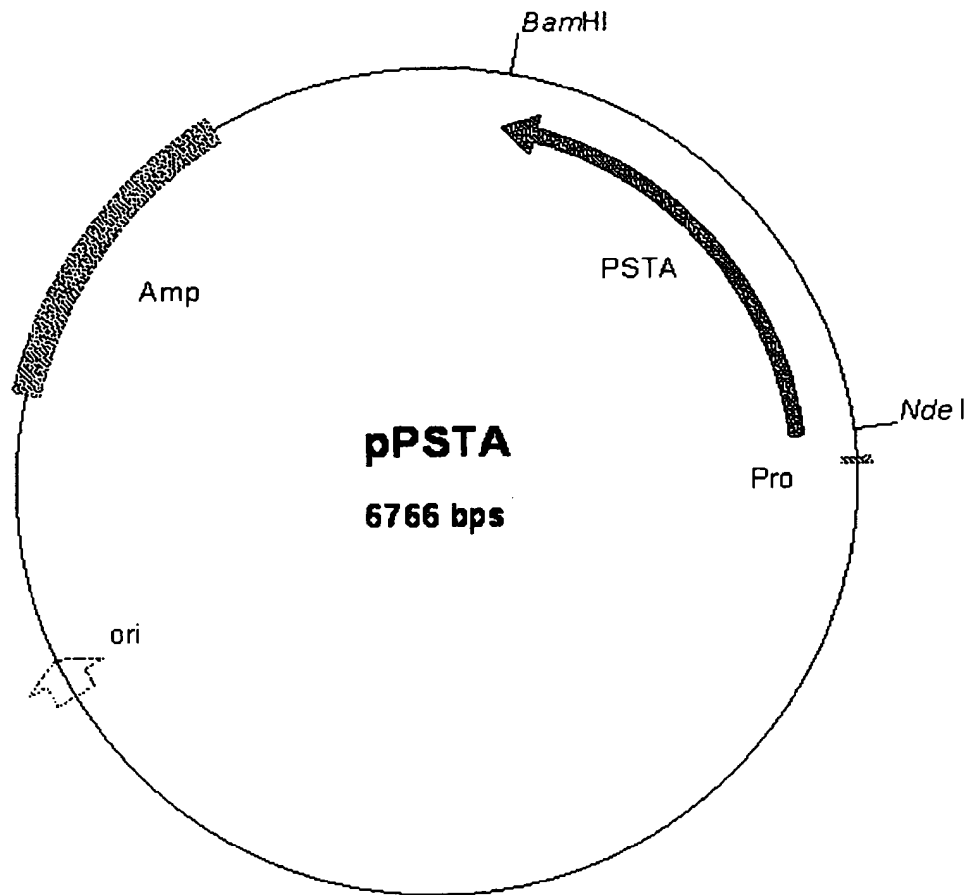


FIG. 19

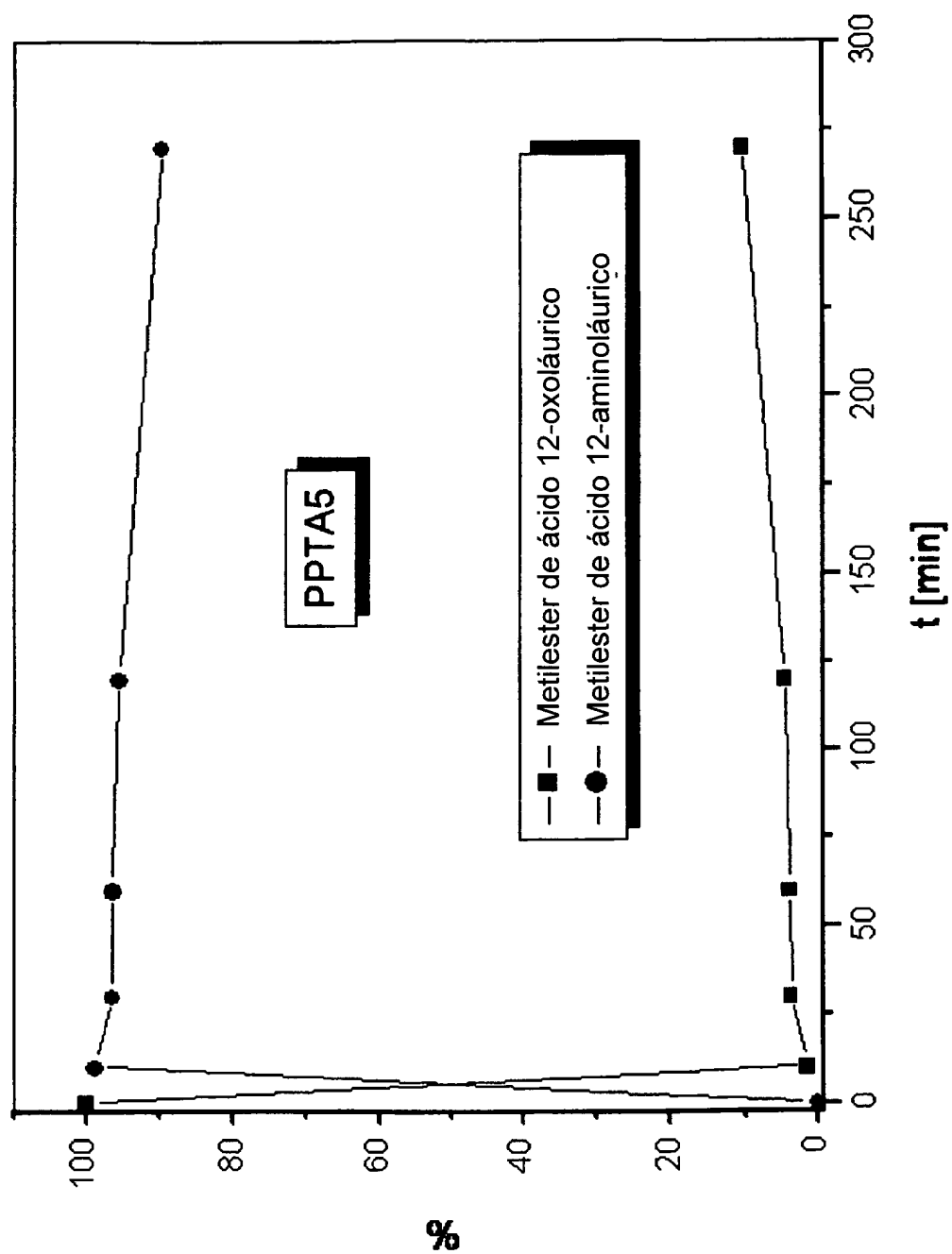


FIG. 20

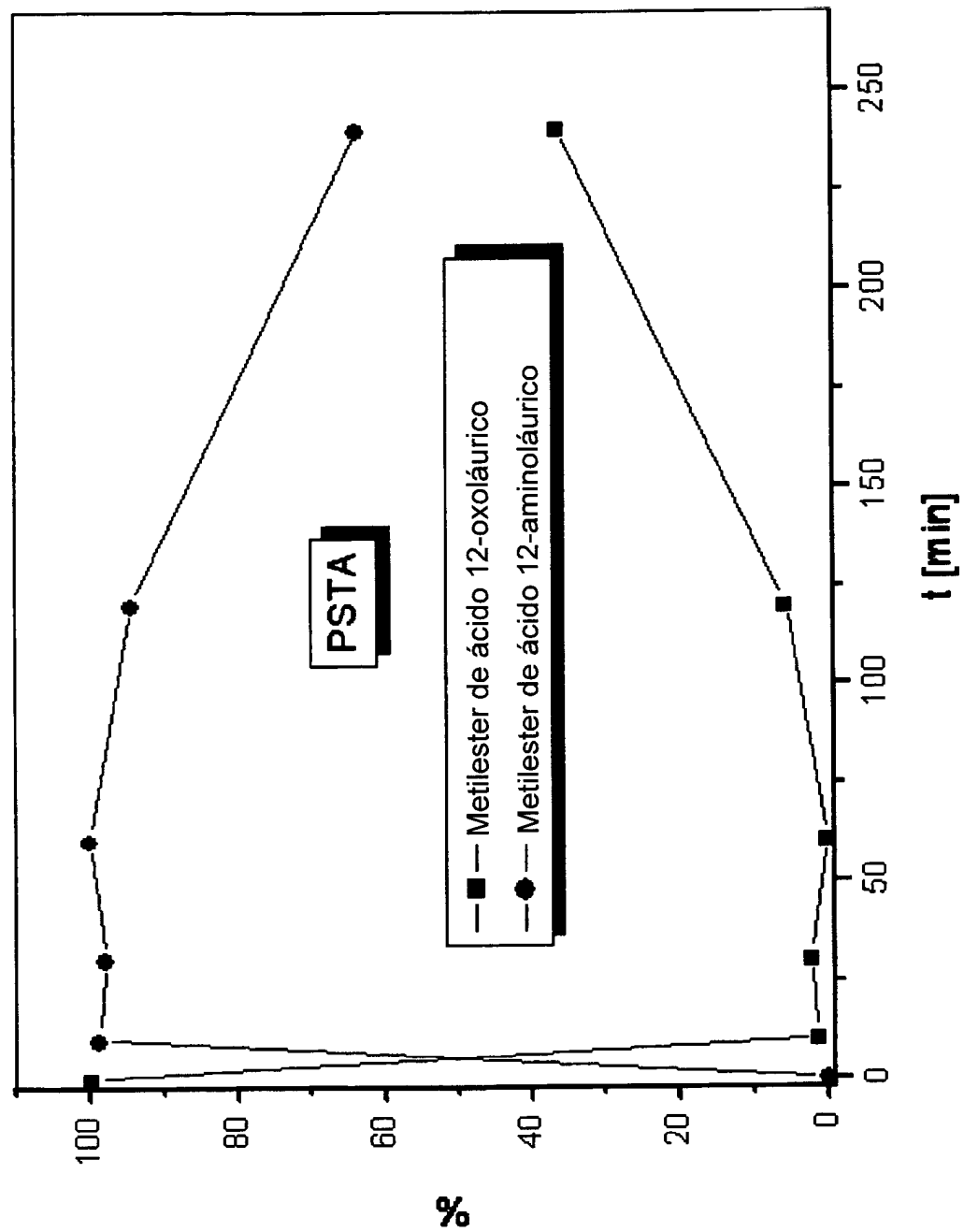


FIG. 21