

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 218**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/88** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 13/02** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04819608 .3**

96 Fecha de presentación: **22.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1689861**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54 Título: **CEPA DE RHODOCOCCUS RHODOCHROUS NCIMB 41164 Y SU USO COMO PRODUCTOR DE NITRILO HIDRATASA.**

30 Prioridad:  
**02.12.2003 GB 0327907**  
**06.10.2004 GB 0422070**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.03.2012**

73 Titular/es:  
**CIBA SPECIALTY CHEMICALS WATER  
TREATMENTS LIMITED  
CLECKHEATON ROAD, LOW MOOR  
BRADFORD, WEST YORKSHIRE BD12 0JZ, GB**

72 Inventor/es:  
**HUGHES, Jonathan;  
ARMITAGE, Yvonne;  
KULLAR, Jatinder y  
GREENHALGH, Stuart**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 376 218 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Cepa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 y su uso como productor de nitrilo hidratasa

La presente invención se refiere a un microorganismo y a métodos para cultivar y almacenar el microorganismo.

5 Se conoce bien el empleo de biocatalizadores, tales como microorganismos que contienen enzimas, para efectuar reacciones químicas. Se sabe que las enzimas nitrilo hidratasa catalizan la hidratación de nitrilos directamente hasta las correspondientes amidas. Típicamente, las enzimas nitrilo hidratasa pueden ser producidas por una variedad de microorganismos, pongamos por caso microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Bacteridium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthobacter*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudonocardia* y *Rhodococcus*.

10 Muchas referencias han descrito la síntesis de nitrilo hidratasa dentro de microorganismos. Arnaud et ál., *Agric. Biol. Chem.* 41: (11) 2183-2191 (1977) describe las características de una enzima que denominan 'acetónitrilasa' en *Brevibacterium* sp R312 que degrada acetónitrilo hasta acetato a través del producto intermedio amídico. Asano et ál., *Agric. Biol. Chem.* 46: (5) 1183-1189 (1982) aislaron *Pseudomonas chlororaphis* B23 que producía nitrilo hidratasa para catalizar la conversión de acrilonitrilo en acrilamida, generando 400 g/l de acrilamida. El artículo de Yamada et ál., *Agric. Biol. Chem.* 50: (11) 2859-2865 (1986), titulado "Optimum culture conditions for production by *Pseudomonas chlororaphis* B23 of nitrile hydratase", consideraba la optimización de los componentes del medio en el medio de crecimiento, incluyendo el inductor añadido para la síntesis de nitrilo hidratasa. Se encontró que la metacrilamida era el mejor inductor para este organismo. Se incluía metacrilamida en el cultivo al comienzo del crecimiento. Se ha encontrado que diversas cepas de la especie *Rhodococcus rhodochrous* producen muy eficazmente la enzima nitrilo hidratasa.

15 Watanabe et ál., *Agric. Biol. Chem.*, 51(12): 3193-3199 (1987) describen el rastreo, el aislamiento y las propiedades taxonómicas de *Rhodococcus* sp. N-774 como una cepa productora de acrilamida. El medio de cultivo usado no comprende urea.

25 EP-0 307 926 describe el cultivo de *Rhodococcus rhodochrous*, específicamente la cepa J1 en un medio de cultivo que contiene iones cobalto. Se describe un procedimiento para producir biológicamente una amida en el que un nitrilo se hidrata mediante la acción de una nitrilo hidratasa producida por *Rhodococcus rhodochrous* J1, que se ha cultivado en presencia de ion cobalto. Se describe el uso de diversos inductores (incluyendo crotonamida) para la síntesis de nitrilo hidratasa. En una realización, se produce una amida en un medio de cultivo del microorganismo en el que está presente un nitrilo como sustrato. En otra realización, se añade un nitrilo como sustrato al medio de cultivo en el que se ha acumulado una nitrilo hidratasa para efectuar la reacción de hidratación. También hay una descripción de aislar las células microbianas y soportarlas en un portador adecuado, pongamos por caso mediante inmovilización, y a continuación ponerlas en contacto con un sustrato. La nitrilo hidratasa puede usarse para hidratar nitrilos en amidas, y en particular la conversión de 3-cianopiridina en nicotinamida.

30 EP-0 362 829 describe un método para cultivar bacterias de la especie *Rhodococcus rhodochrous* que comprende al menos uno de urea e ion cobalto para preparar las células de *Rhodococcus rhodochrous* que tienen actividad de nitrilo hidratasa. Se describe específicamente la inducción de nitrilo hidratasa en *Rhodococcus rhodochrous* J1 usando urea o derivados de urea, lo que incrementa notablemente la actividad de nitrilo hidratasa. La urea o sus derivados se añaden al medio de cultivo en una partida en un momento o secuencialmente y el cultivo se produce a lo largo de 30 horas o más, pongamos por caso hasta 120 horas.

35 Un artículo de Nagasawa et ál., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 783-788 (1991), titulado "Optimum culture conditions for the production of cobalt-containing nitrile hydratase by *Rhodococcus rhodochrous* J1", describe aislar J1 como una cepa que utiliza acetónitrilo que sintetiza dos nitrilo hidratasas diferentes y una nitrilasa dependiendo de las condiciones de cultivo usadas. Una nitrilo hidratasa es inducida óptimamente por urea y análogos de urea. La urea se añade al comienzo del procedimiento de cultivo y parece hacerse eficaz como un inductor sólo cuando el medio basal es rico en nutrientes. La inducción de la enzima empezaba gradualmente y se incrementaba en crecimiento hasta que alcanzaba un máximo después de 5 días de cultivo. Se encontró que la actividad disminuía con el cultivo prolongado.

40 *Rhodococcus rhodochrous* J1 también se usa comercialmente para fabricar monómero de acrilamida a partir de acrilonitrilo y este procedimiento ha sido descrito por Nagasawa y Yamada *Pure Appl. Chem.* 67: 1241-1256 (1995).

45 Leonova et ál., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 88: 231-241 (2000), titulado "Nitrile Hydratase of *Rhodococcus*", describe el crecimiento y la síntesis de nitrilo hidratasa en *Rhodococcus rhodochrous* M8. La síntesis de nitrilo hidratasa de esta cepa es inducida por urea en el medio, actuando además la urea como una fuente de nitrógeno para el crecimiento mediante este organismo. También se requiere cobalto para una alta actividad de nitrilo hidratasa. Este

documento bibliográfico estudia la inducción y los efectos metabólicos en general.

Leonova et ál., Appl. Biochem. Biotechnol. 88: 231-241 (2000) también indica que la acrilamida es producida comercialmente en Rusia usando *Rhodococcus rhodochrous* M8. La patente rusa 1731814 describe *Rhodococcus rhodochrous* cepa M8.

5 Precigou et ál., FEMS Microbiol. Lett. 204: 155-161 (2001) describen el uso de PCR para extraer DNA de muestras de suelo y para buscar genes de nitrilo hidratasa en el DNA extraído. Ambos tipos de genes que codifican nitrilo hidratasa que contienen hierro y cobalto se detectaron en DNA procedente de cultivos puros y muestras de suelo. *Rhodococcus rhodochrous* cepa M33 que produce nitrilo hidratasa sin la necesidad de un inductor tal como urea se describe en US-A-5827699. Esta cepa de microorganismo es un derivado de *Rhodococcus rhodochrous* M8.

10 La producción de monómero de acrilamida en particular es deseable a través de la ruta biocatalítica. En la publicación revisada de Yamada y Kobayashi, Biosci. Biotech. Biochem. 60: (9) 1391-1400 (1996), titulada "Nitrile Hydratase and its Application to Industrial Production of Acrylamide", se describe un informe detallado del desarrollo de una ruta biocatalítica hacia acrilamida. Tres catalizadores sucesivamente mejores y sus características para la producción de acrilamida y en particular el catalizador de tercera generación *Rhodococcus rhodochrous* J1 se describen con algún detalle.

15 Una desventaja importante del uso de biocatalizadores es la falta general de estabilidad observada con material microbiano húmedo durante el almacenamiento, el transporte y el uso. Incluso con enzimas y bacterias relativamente estables tales como hidratasa en células de rodococo, el potencial de deterioro antes del uso ha conducido a una aceptación dentro de la industria de la necesidad de procesar la suspensión de células biocatalíticas de algún modo, p. ej., mediante congelación o secado por congelación de la mezcla acuosa o  
20 alternativamente inmovilización de las células en alguna matriz de polímero. A fin de alcanzar una productividad máxima del biocatalizador, es importante que la actividad biocatalítica máxima se retenga durante su preparación y almacenamiento antes del uso. En Chaplin y Bucke (1990) En: Enzyme Technology, publicado por Cambridge University Press, p 47 (Enzyme preparation and use), se identificó que la desactivación de la enzima puede estar  
25 provocada por calor, proteólisis, pH subóptimo, oxidación, desnaturizantes e inhibidores irreversibles. Un número de sustancias puede provocar una reducción en el grado de la capacidad de la enzima para catalizar una reacción. Esto incluye sustancias que son desnaturizantes de proteínas no específicos, tales como urea.

30 En la presentación, Protein Stability, de Willem JH van Berkel, Wageningen University, se consideraron los factores que pueden provocar la desactivación o el despliegue y estos incluían proteasas, oxidación debida a la presencia de oxígeno o radicales oxígeno y agentes desnaturizantes que provocan un despliegue irreversible, tales como urea.

35 Chaplin y Bucke (1990) en Enzyme Technology, publicado por Cambridge University Press, p 73 (Enzyme preparation and use) revelaban que el factor clave relativo a la conservación de la actividad de la enzima implica mantener la conformación de la estructura de la enzima. Por lo tanto, se consideraba importante evitar el despliegue, la agregación y cambios en la estructura covalente. Se consideraron tres enfoques para conseguir esto: (1) uso de aditivos; (2) el uso controlado de modificación covalente; y (3) inmovilización de la enzima.

40 EP-B-0 243 967 describe la conservación de la actividad de hidratación de nitrilo de la nitrilasa mediante la adición de compuestos estabilizantes seleccionados de nitrilos, amidas y ácidos orgánicos y sus sales, a una solución o suspensión de la enzima o la forma inmovilizada de la enzima. Indica claramente en la descripción que, aunque una solución o suspensión del microorganismo capaz de producir nitrilasa que hidrata nitrilos tales como acrilonitrilo para producir las correspondientes amidas tales como acrilamida puede almacenarse a temperatura ambiente siempre y cuando el período de almacenamiento sea corto, se prefiere el almacenamiento a una temperatura baja, especialmente a una temperatura en la proximidad de 0°C. Se describió en EP-A-0 707 061 que la adición de sales inorgánicas a una concentración de entre 100 mM y la concentración de saturación de las sales inorgánicas a un medio acuoso que contiene bien una suspensión de células microbianas o bien células microbianas inmovilizadas  
45 conservaba las células y la actividad enzimática durante un período de tiempo prolongado. Esta técnica se describe para la conservación de células microbianas que tienen actividad de nitrilo hidratasa o nitrilasa. La adición de sales de bicarbonato o carbonato a una solución acuosa de células microbianas inmovilizadas o no inmovilizadas que tienen actividad de nitrilasa se describe en US-B-6.368.804. La inmovilización ha implicado frecuentemente la retirada de la enzima de la célula entera, antes de inmovilizar la enzima en una matriz. Sin embargo, aunque tal inmovilización proporcione una protección muy buena para la enzima, la extracción de la enzima de la célula entera es una etapa intrincada, que puede ser prolongada, costosa y puede conducir a pérdida de la enzima. Adicionalmente, las células microbianas enteras pueden inmovilizarse. US-A-5.567.608 proporciona un procedimiento para inmovilizar un biocatalizador de células enteras en un copolímero catiónico que tiene buena estabilidad al almacenamiento y evita la putrefacción.

55 *Rhodococcus rhodochrous* J1, que se usa comercialmente para fabricar monómero de acrilamida, se inmoviliza para (a) permitir el transporte y (b) incrementar la longevidad del biocatalizador en uso. En US-A-5.567.608, los inventores indican que los biocatalizadores se inmovilizan normalmente para el uso a escala industrial, para facilitar

5 la separación del biocatalizador del producto de reacción, evitar que las impurezas procedentes del biocatalizador se eluyan en el producto y para ayudar en los procedimientos continuos y el reciclaje del biocatalizador. Sin embargo, la inmovilización es una etapa de procesamiento extraordinaria que requiere una planta adicional y el uso potencialmente de un número de otras materias primas tales como alginato, carragenina, acrilamida y otros monómeros de acrilato, y alcohol vinílico. Así, esta es una etapa de procesamiento costosa.

Se han propuesto varios otros modos para minimizar los efectos perjudiciales de la desactivación de enzimas en un intento de reducir el impacto negativo sobre un procedimiento de reacción química.

10 También se conoce la congelación de biocatalizadores secos a fin de conservar la actividad de una enzima durante el almacenamiento a lo largo de un período de tiempo prolongado. De nuevo, esta es una etapa de procesamiento potencialmente costosa que normalmente se lleva a cabo con biocatalizadores preparados a pequeña escala. La criopreservación en nitrógeno líquido o en fase de vapor también permite el almacenamiento a largo plazo de células microbianas pero requiere un suministro constante de nitrógeno líquido. También se sabe que la congelación de biomasa recuperada o enzimas semipuras o puras a temperaturas de  $<-18^{\circ}\text{C}$  conserva la actividad biocatalítica durante períodos de tiempo prolongados.

15 Por otra parte, una vez que la masa celular se introduce en el reactor y está teniendo lugar la reacción, la minimización de la pérdida de eficacia es crítica para la eficacia funcional y la economía del procedimiento. Una vez más, la inmovilización de las células microbianas en alguna matriz de polímero es un procedimiento estándar para optimizar estos parámetros del procedimiento.

20 Por lo tanto, sería deseable proporcionar un procedimiento y un biocatalizador en los que pudieran vencerse estas desventajas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un microorganismo que es *Rhodococcus rhodochrous* cepa NCIMB 41164.

25 Se ha encontrado que este nuevo microorganismo produce fácilmente nitrilo hidratasa. Se ha encontrado que este nuevo microorganismo puede usarse en un procedimiento para convertir nitrilos en la amida. *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 es particularmente útil en la conversión de (met)acrilonitrilo en (met)acrilamida. Se ha encontrado que el microorganismo permanece activo, y en algunos casos incluso incrementa la actividad, durante largos períodos de tiempo y por otra parte puede recuperarse de la mezcla de reacción con actividad no disminuida después de la preparación de acrilamida en  $>50\%$  p/p. Así, si se requiere, puede reutilizarse bien directamente o bien después de un período de almacenamiento adicional.

30 Los detalles de la nueva cepa *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se dan posteriormente:

#### 1. Origen y Deposición

La cepa de *Rhodococcus rhodochrous* fue aislada por los presentes inventores en Bradford, Inglaterra y se depositó el 5 de marzo de 2003 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), donde se le asignó el número de registro NCIMB 41164 de acuerdo con el Tratado de Budapest.

#### 35 2. Identificación taxonómica del microorganismo

40 La identificación del aislado de suelo se llevó a cabo usando la técnica del análisis de rDNA 16S. La secuencia del gen de rDNA 16S obtenida del aislado de suelo se comparó con bases de datos de secuencias de ácido nucleico. La secuencia obtenida se comparó con la encontrada en una base de datos patentada (Microseq™) y se determinaron los 20 aciertos principales. La comparación de la secuencia con esta base de datos identificaba la mejor coincidencia como *Rhodococcus rhodochrous* con una similitud de 97,48%. Esta es una coincidencia a nivel de género, pero lo más probablemente era una cepa de *Rhodococcus rhodochrous*. Una búsqueda adicional frente a la base de datos EMBL pública identificaba la mejor coincidencia para esta base de datos con *Rhodococcus rhodochrous* con una similitud de 99,698%.

#### 3. Características morfológicas y de cultivo

- 45
- (1) Crecimiento polimórfico
  - (2) Movilidad: inmóvil
  - (3) No formadora de esporas

(4) Gram positiva

(5) Aeróbica

(6) El crecimiento sobre agar con nutrientes da colonias redondas rosa salmón en 48 horas a 30°C

#### 4. Cultivo y Síntesis de Nitrilo Hidratasa

5 La *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 de la presente invención puede cultivarse bajo cualesquiera condiciones adecuadas para el propósito de acuerdo con cualquiera de los métodos conocidos, pongamos por caso según se describe en la susodicha técnica anterior. El microorganismo se cultiva en un medio de cultivo que comprende urea o un derivado de urea. Se ha encontrado que este microorganismo puede hacerse crecer en un medio que contiene acetonitrilo o acrilonitrilo como un inductor de la nitrilo hidratasa. En presencia de urea o derivado de urea como un inductor y cloruro de cobalto como una fuente de iones cobalto, se alcanza una actividad de nitrilo hidratasa muy alta. Por ejemplo, se añaden urea y cobalto al medio descrito en los ejemplos experimentales.

15 Deseablemente, la *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 puede cultivarse para dar alta actividad de la enzima, pongamos por caso aproximadamente 250-300.000  $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{g}$  de biomasa seca a 15°C. Puede alcanzarse una alta actividad de nitrilo hidratasa si está presente urea o un derivado de urea en el medio de cultivo. Puede estar presente al comienzo del cultivo o puede añadirse en algún punto durante el crecimiento, pero generalmente debe añadirse antes del inicio de la fase estacionaria de crecimiento. Una alta actividad de nitrilo hidratasa puede alcanzarse preferiblemente si no está presente la urea o el derivado de urea en ninguna cantidad sustancial en el medio de cultivo al principio del crecimiento del microorganismo sino que se introduce más tarde. Por esto se entiende que la urea o el derivado de urea no está presente o está presente en una cantidad de menos de 0,2 g/l, preferiblemente menos de 0,1 g/l. Más preferiblemente, el medio de cultivo está sustancialmente libre (es decir, menos de 0,2 g/l) de la urea o el derivado de urea durante al menos las seis primeras horas de crecimiento del microorganismo. Se prefiere especialmente que el medio de crecimiento del microorganismo esté sustancialmente libre de urea o el derivado de urea durante al menos 12 horas y en algunos casos al menos 24 horas antes de la introducción de la urea o el derivado de urea ya que la velocidad de crecimiento del microorganismo es superior en ausencia de la urea o el derivado de urea, pero que se añada antes de las 48 horas de cultivo del microorganismo. Se ha encontrado que esto permite que se produzca una actividad superior de nitrilo hidratasa en un período de tiempo más corto que si la urea o el derivado de urea se ha añadido al principio del cultivo.

30 Un aspecto adicional de la invención trata de un procedimiento para preparar una amida a partir del nitrilo correspondiente, en el que el nitrilo se somete a una reacción de hidratación en un medio acuoso en presencia de un biocatalizador que es el microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164. Posteriormente en la presente memoria, el término 'biocatalizador' se refiere a la propia célula de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164. Así, el biocatalizador podría usarse como una preparación de células enteras en un medio de fermentación, como una suspensión acuosa, como una pasta celular recuperada o como una preparación de células inmovilizadas.

35 Este procedimiento es particularmente adecuado para preparar fácilmente una amida a partir del nitrilo correspondiente. En particular, pueden prepararse soluciones acuosas de amida con alta concentración. El procedimiento es especialmente adecuado para preparar acrilamida o metacrilamida.

40 El biocatalizador puede usarse como un catalizador de células enteras para la generación de amida a partir de nitrilo. Puede inmovilizarse, pongamos por caso, atrapado en un gel o puede usarse preferiblemente como una suspensión de células libres.

45 En un modo preferido para llevar a cabo el procedimiento, el biocatalizador se introduce en un medio acuoso adecuado para llevar a cabo el cultivo del microorganismo. Típicamente, puede formarse una suspensión del biocatalizador, pongamos por caso células enteras del microorganismo. Un nitrilo, pongamos por caso acrilonitrilo o metacrilonitrilo, se alimenta al medio acuoso que comprende el biocatalizador de tal modo que la concentración de (met)acrilonitrilo en el medio acuoso se mantenga hasta 6% en peso. Un nitrilo tal como acrilonitrilo o metacrilonitrilo se alimenta más preferiblemente al medio de reacción y la reacción se deja continuar hasta que la concentración de amida, pongamos por caso acrilamida o metacrilamida, alcance el nivel deseado, en particular entre 30 y 55% en peso. Lo más preferiblemente, la concentración es alrededor de 50% en peso.

50 Esta nueva cepa de *Rhodococcus rhodochrous* (NCIMB 41164) es capaz de producir soluciones acuosas de acrilamida en alta concentración (pongamos por caso 50% de acrilamida). Deseablemente, la reacción puede llevarse a cabo como un procedimiento de células libres usando un reactor de tipo de alimentación discontinua al que se añade el biocatalizador (*Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164) en forma de caldo de fermentación o como biomasa recogida.

La actividad del biocatalizador (*Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164) y la nitrilo hidratasa producida a partir del mismo es tal que puede reciclarse y reutilizarse para una hidratación adicional de nitrilo en la amida correspondiente.

5 El reciclaje del biocatalizador es particularmente adecuado para cualquier caso de conversión de (met)acrilonitrilo en (met)acrilamida. Así, en la fabricación de acrilamida cuando el procedimiento de reacción es completo y la acrilamida se ha producido en la concentración apropiada, el catalizador puede retirarse y reutilizarse para producir otra partida de acrilamida sin pérdida en la actividad de nitrilo hidratasa. Esto puede conseguirse incluso después de que el biocatalizador se haya almacenado en agua durante varios días (pongamos por caso tres días) antes de la reutilización. Incluso es posible preparar una tercera partida de acrilamida, incluso después de un almacenamiento adicional.

10 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición acuosa que comprende un biocatalizador que es el microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* cepa NCIMB 41164 y en la que el biocatalizador está en la forma de un microorganismo de células libres que crecen no activamente. También se proporciona un método para almacenar el biocatalizador, que está en la forma de un microorganismo de células libres que crecen no activamente.

15 Las células microbianas del biocatalizador usado para llevar a cabo la conversión de nitrilo en amida pueden considerarse como un cultivo que crece no activamente. Por esto se entiende que no se esperaría que el medio y las condiciones de almacenamiento en las que se mantiene el microorganismo promovieran el crecimiento. El medio de almacenamiento puede, pongamos por caso, ser las células de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 que pueden recuperarse del medio de fermentación. O las células pueden usarse directamente en el medio de fermentación, o pueden estar presentes como una suspensión acuosa en un medio de suspensión adecuado, pongamos por caso agua; solución salina fisiológica; una solución tamponadora adecuada tal como tampón de fosfato o cualquier otro tampón similar o un medio de crecimiento en el que el metabolismo en las células del microorganismo sea sustancialmente cero según se determina al medir la velocidad de crecimiento, o la concentración de biomasa o el consumo de oxígeno o el consumo de nutrientes, u otra forma de medida usada generalmente para verificar el crecimiento y el metabolismo microbianos.

20 La composición o el medio de almacenamiento pueden comprender cualesquiera componentes residuales del caldo de fermentación. El caldo de fermentación puede incluir cualquiera de los ingredientes típicos usados para cultivar el microorganismo y también puede incluir productos y subproductos producidos por el microorganismo. Componentes típicos del caldo de fermentación incluyen azúcares, polisacáridos, proteínas, péptidos, aminoácidos, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas, reguladores del crecimiento e inductores de enzimas. Específicamente, esto podría incluir monosacáridos o disacáridos como azúcares; sales amónicas u otras fuentes de nitrógeno; sales inorgánicas tales como fosfatos, sulfatos, sales magnésicas, cálcicas, sódicas y potásicas; compuestos metálicos; vitaminas; y componentes de medios de fermentación complejos, por ejemplo licor de maceración de maíz; peptona; extracto de levadura; compuestos orgánicos o inorgánicos que pueden usarse para requerimientos de crecimiento microbiano específicos; inductores de enzimas específicos (tales como urea que se usa para inducir la nitrilo hidratasa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164); y ácidos orgánicos tales como citrato o piruvato; y cualesquiera otros compuestos orgánicos o inorgánicos que puedan requerirse para asegurar un crecimiento satisfactorio de la *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164.

30 Habitualmente, cuando un biocatalizador, tal como uno que produce nitrilo hidratasa, se almacena sin crecimiento continuado durante un período de tiempo, incluso durante unos pocos días, es normal retirar las células microbianas del caldo de fermentación, ya sean las células las que se requieren como el catalizador, o ya se recupere la enzima de las células o el medio de fermentación. Esto es para prevenir el crecimiento microbiano en el caldo de fermentación que provoca la putrefacción del caldo y para reducir la actividad de proteasa que puede provocar la descomposición de la enzima que se requiere. Por lo tanto, es normal conservar el caldo de fermentación como tal o retirar las células para prevenir la degradación del biocatalizador a través de actividad biológica extraña tal como contaminación microbiana. Podría esperarse normalmente que la actividad biocatalítica se redujera en un período de tiempo muy corto tal como en menos de un día y ciertamente en menos de dos días si esto no se llevaba a cabo.

35 Los métodos para conservar la actividad durante el almacenamiento de biocatalizadores, incluso durante períodos de tiempo de hasta una semana, normalmente han implicado la retirada del biocatalizador del caldo de fermentación y/o la inmovilización del biocatalizador en una matriz adecuada y/o la estabilización usando sustancias estabilizantes, que a continuación bien se convierten en contaminantes en la mezcla de reacción y así pueden ser un problema más aguas abajo o bien se requiere una etapa de procesamiento adicional para retirar el compuesto estabilizante o aditivo de la suspensión de células microbianas antes de que se use como un biocatalizador.

40 En ausencia de tal conservación, los tratamientos y normalmente los biocatalizadores que se mantienen a temperaturas ambiente tienden a perder actividad hasta el punto de que ya no son eficaces o incluso adecuados para reacciones catalíticas.

55 El crecimiento de un microorganismo para el uso como un biocatalizador puede tener lugar durante un período de

varios días. Durante este tiempo, el microorganismo está creciendo activamente, es decir un crecimiento equilibrado en el que la biomasa se está incrementando junto con un incremento y un mantenimiento de la composición química global de la célula.

5 Normalmente, el crecimiento de microorganismos está limitado bien por el agotamiento de nutriente o la acumulación de productos tóxicos del metabolismo y la velocidad de crecimiento se reduce. El crecimiento se mantiene al alimentar nutrientes apropiados y mantener una temperatura y un pH correctos durante el crecimiento y cuando se requiera suministrar oxígeno.

10 El método de almacenamiento descrito en la presente promueve la estabilidad eficaz de modo que el biocatalizador pueda usarse fácilmente sin ninguna pérdida significativa en la actividad. La estabilidad al almacenamiento se consigue sin la necesidad de recurrir a, pongamos por caso, inmovilización, adición de compuestos estabilizantes o secado por congelación. La estabilidad al almacenamiento puede conseguirse sin recurrir a la retirada de ninguno de los componentes del caldo de fermentación, tales como urea o derivados de urea, aun cuando la urea sea un conocido desactivador de proteínas.

15 La composición o el ambiente usados en el método de almacenamiento puede contener oxígeno o puede ser un ambiente sustancialmente libre de oxígeno. Por libre de oxígeno se entiende que la concentración de oxígeno debe ser menor de 1% de concentración de oxígeno disuelto. La retirada de oxígeno del caldo de fermentación puede conseguirse mediante cualquiera de los métodos convencionales para retirar oxígeno. Estos incluyen purgar durante un período de tiempo con un gas inerte, la retirada de cualquier espacio vacío en el recipiente de almacenamiento, el almacenamiento bajo presión disminuida o la adición de eliminadores de oxígeno conocidos tales como ácido ascórbico o hidrazina e hidrazida.

20 Se esperaría que después de 2 días y especialmente después de varios días de almacenamiento hubiera algo menos de actividad de nitrilo hidratasa. Esto se esperaría incluso en ausencia de oxígeno. Se esperaría especialmente en presencia de componentes residuales del caldo de fermentación, tales como urea, y también a temperaturas de más de 0°C. Esto se debe a que podríamos esperar que las enzimas proteasa en el biocatalizador descompusieran otras proteínas de la célula, incluyendo la nitrilo hidratasa. Por otra parte, podría esperarse que la presencia de urea o derivado de urea fuera perjudicial, ya que se sabe que la urea es un desactivador de proteínas. Sin embargo, el biocatalizador no sufre ninguna de las desventajas esperadas y así no sufre una pérdida significativa en la actividad de nitrilo hidratasa. Por el contrario, se encuentra que durante el período de almacenamiento la actividad del biocatalizador que comprende nitrilo hidratasa puede en algunos casos incrementarse realmente. Así, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para incrementar la actividad de nitrilo hidratasa de un biocatalizador capaz de formar nitrilo hidratasa al almacenar el biocatalizador en un medio de almacenamiento de acuerdo con el método de almacenamiento de la presente invención. Por lo tanto, el método puede dar como resultado una nueva composición de biocatalizador en virtud de su actividad incrementada. Por lo tanto, la nitrilo hidratasa de la composición de biocatalizador, y en particular formada durante el almacenamiento del biocatalizador, es nueva. Además, el biocatalizador no produce los malos olores asociados con la putrefacción durante el período de almacenamiento.

Preferiblemente, el método de almacenamiento permite que el biocatalizador se almacene durante al menos dos días y más preferiblemente una o más semanas. En particular, el biocatalizador puede almacenarse de tres a veintiocho días, por ejemplo de 3 a 14 días.

40 La presencia de componentes del caldo de fermentación tales como urea no es esencial para la composición o el método de almacenamiento de este aspecto de la invención. Cuando están presentes componentes del caldo de fermentación, estos pueden ser urea o un derivado de urea. El derivado de urea puede ser, por ejemplo, un derivado alquílico de urea.

45 La urea o el derivado de urea podría estar presente en la composición de biocatalizador a través de su inclusión en la mezcla de fermentación. En una forma de la invención, la composición o el medio de almacenamiento que contiene el biocatalizador puede desoxigenarse y contener componentes del caldo de fermentación tales como urea.

50 Una característica particularmente ventajosa de este aspecto de la invención es que ya no es necesario separar el biocatalizador de la mezcla de fermentación en la que se cultivaba. Esto es de un valor significativo ya que evita el requisito de una etapa de procesamiento adicional. Por lo tanto, la composición también puede comprender una mezcla de fermentación, que se almacena a continuación. En el método de almacenamiento del biocatalizador, se encuentra que esto también puede conseguirse en presencia de una mezcla de fermentación sin ningún efecto perjudicial sobre la actividad de la enzima. Esto permite entonces que el caldo de fermentación se use inmediatamente para catalizar la reacción, o para permitir que se almacene durante varios días o incluso semanas sin perjuicio mientras la etapa de bioconversión también se está llevando a cabo durante un período de varios días, asegurando así un suministro constante de biocatalizador fácilmente disponible sin la necesidad de etapas de procesamiento adicionales, de ese modo simplificando y reduciendo el coste de la etapa de bioconversión.

El biocatalizador puede almacenarse convenientemente a temperaturas por encima de su punto de congelación. Típicamente, el biocatalizador puede almacenarse a temperaturas ambiente, pongamos por caso hasta 30 o 40°C. Sin embargo, la ventaja del presente método es que el biocatalizador puede almacenarse a temperaturas ambiente sin ninguna precaución especial para verificar y controlar la temperatura. Preferiblemente, el biocatalizador se almacena a una temperatura entre 4 y 30 o 40°C, más preferiblemente entre 5 y 25°C, tal como entre 10 y 25°C y en particular de 15 a 25°C.

Según se indica previamente, no es necesario retirar el biocatalizador de la mezcla de fermentación en la que se ha preparado el biocatalizador. Así, en una forma preferida, el ambiente en el que se mantiene el biocatalizador también contiene componentes de un caldo de fermentación. Por lo tanto, una composición de biocatalizador que contiene componentes de un caldo de fermentación puede combinarse con un nitrilo que a continuación se hidrata hasta la amida correspondiente. Se ha encontrado sorprendentemente que, en contraste con el conocimiento previo, pongamos por caso en US-A-5,567.608 se establece que la inmovilización del biocatalizador es preferible para evitar la elución de impurezas procedentes del biocatalizador en el producto de reacción, la inclusión de caldo de fermentación en la mezcla de reacción no afecta a la calidad del producto final y este aspecto se describe en la solicitud del Reino Unido de los presentes inventores copresentada 0327901.5, identificada por el número de caso BT/3-22349/P1.

La mezcla de fermentación comprenderá componentes esenciales para permitir que los microorganismos se hagan crecer y mantenerse. En general, la mezcla contendrá al menos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y diversos nutrientes. Esto puede incluir un sacárido, pongamos por caso un monosacárido tal como glucosa u otro azúcar o un disacárido o polisacárido, sales amónicas, componentes complejos del medio tales como extracto de levadura y peptona, aminoácidos, vitaminas, sales de fosfato, sales potásicas, sódicas, magnésicas y cálcicas, elementos traza tales como hierro, cobalto, manganeso, cobre, zinc y similares. Estos y otros ingredientes pueden incluirse en la mezcla de fermentación en concentraciones adecuadas para el microorganismo particular. Se sabe que las fermentaciones pueden estar sometidas a cambios en la productividad del biocatalizador y el caldo de fermentación puede usarse en diferentes fases de crecimiento y así es importante ser capaz de almacenar el biocatalizador después de la producción de tal modo.

Se encuentra que la actividad del biocatalizador no disminuye significativamente durante la reacción a lo largo de un período prolongado. Por consiguiente, el biocatalizador puede reemplazarse menos frecuentemente. Preferiblemente, el biocatalizador se usa a lo largo de un período de al menos 2 días y sustancialmente no pierde actividad durante ese período. Generalmente, la catálisis de la reacción usando nitrilo hidratasa permite que el nitrilo se convierta en la amida correspondiente en una sola etapa. Este procedimiento es de valor particular cuando el nitrilo es acrilonitrilo y la amida es acrilamida. Es deseable llevar a cabo esta etapa de conversión varias veces usando una sola partida de biocatalizador de la que se retiran porciones durante un período de varios días para llevar a cabo varias reacciones cuando se convierte nitrilo en amida. Así, es importante ser capaz de almacenar el biocatalizador tan económicamente como sea posible sin perjuicio para el catalizador mientras la etapa de bioconversión se lleva a cabo simultáneamente. Así, en efecto, una partida de biocatalizador puede almacenarse lista para el uso para formar varias partidas de, pongamos por caso, acrilamida. Varias partidas podrían ser de 5 a 10 o más partidas, incluso de 15 a 20 partidas.

En un aspecto adicional de la invención, se ha encontrado un modo de mejorar la actividad biocatalítica del microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164. El microorganismo se cultivaría en un medio de cultivo que comprendiera urea o un derivado de urea. Sin embargo, la urea o el derivado de urea se introduce en el medio de cultivo al menos seis horas después del principio del crecimiento del microorganismo. Normalmente, el medio de cultivo está sustancialmente libre de la urea o el derivado de urea a lo largo de al menos las primeras seis horas de cultivo del microorganismo y posteriormente se añade urea o un derivado de urea al medio de cultivo. Según se indica previamente, por sustancialmente libre se entiende que el medio de cultivo contiene menos de 0,2 g/l, habitualmente menos de 0,1 g/l y puede no contener la urea o el derivado de urea. Preferiblemente, el medio de cultivo está sustancialmente libre de la urea o el derivado de urea a lo largo de al menos 12 horas y a veces al menos 24 horas. Sin embargo, a fin de maximizar la actividad biocatalítica, se prefiere introducir la urea o el derivado de urea antes de las 48 horas de cultivo.

La actividad biocatalítica puede establecerse en términos de actividad de la enzima, según se describe en la presente memoria.

Los siguientes ejemplos proporcionan una ilustración de cómo llevar a cabo la invención.

### Ejemplo 1

*Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se aisló del suelo usando una técnica de cultivo de enriquecimiento y se hizo crecer sobre un medio que contenía los siguientes constituyentes (g/l):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,0; peptona, 5,0; extracto de levadura, 3,0; glucosa, 5,0;  $\text{MgSO}_4$ , 0,5; solución de metales traza, 5 ml; acetonitrilo, 20 ml. El pH se ajustó hasta 7,2. La actividad de nitrilo hidratasa será 4.000  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}$  de células secas a 15°C después de 3 días



de crecimiento a 28°C.

**Ejemplo 2**

5 (1) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en un matraz Erlenmeyer tabicado de 2 l que contenía 400 ml de medio de cultivo que contenía los siguientes constituyentes (g/l): hidrogenofosfato dipotásico, 0,7; hidrogenofosfato potásico, 0,3; glucosa, 10,0; peptona, 1,0; extracto de levadura, 3,0; heptahidrato de sulfato magnésico, 0,5; urea, 5,0; hexahidrato de cloruro de cobalto, 0,01; agua corriente hasta 1 l. El pH del medio se ajustó hasta pH 7,2. El cultivo se hizo crecer a 28°C a lo largo de 5 días, después de lo cual la actividad de nitrilo hidratasa era 47.900  $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{g}$  a 15°C.

10 (2) (a) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en el medio descrito en (1), excepto que se omitió la peptona.

(b) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en el medio descrito en (2a), excepto que se omitió la peptona y también la urea. El organismo se cultivó a lo largo de 24 horas y a continuación se añadieron 5 g/l de urea al cultivo que se hizo crecer a lo largo de 5 días más.

15 (c) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en el medio descrito en (2a), excepto que no se incluyó urea en el medio. El organismo se cultivó a lo largo de 48 horas y a continuación se añadieron 5 g/l de urea al cultivo que se hizo crecer a lo largo de 4 días más.

(d) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en el medio descrito en (2a), excepto que no se incluyó urea en el medio. El organismo se cultivó a lo largo de 6 días.

20 Se tomaron muestras de los cuatro cultivos descritos anteriormente en el tiempo = 1, 2, 3 y 6 días después de que comenzara el crecimiento. Las actividades de nitrilo hidratasa se midieron a 15°C, véase la tabla 1.

Tabla 1

Tiempo de la adición de urea (días)	Actividad de nitrilo hidratasa $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{mg}$ de células secas			
	T = 1 día	T = 2 días	T = 3 días	T = 6 días
0	9,1	24,2	24,8	37,6
1	1,0	21,6	49,3	41,3
2	ND	ND 1	15,1	15,3
Nada añadido	0,94	ND	0,46	0,98
ND no determinado				

**Ejemplo 3**

25 (1) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en un fermentador de 280 l que contenía 180 l de medio de cultivo que contenía los siguientes constituyentes (g/l): hidrogenofosfato dipotásico, 0,7; hidrogenofosfato potásico, 0,3; glucosa, 2,0; extracto de levadura, 3,0; heptahidrato de sulfato magnésico, 0,5; hexahidrato de cloruro de cobalto, 0,01. El pH del medio se ajustó hasta pH 7,2. El cultivo se hizo crecer a 30°C a lo largo de 3 días. Se añadió urea al cultivo después de 17 h. La actividad de nitrilo hidratasa se midió (a 30°C) periódicamente. 22 h después la urea se añadió y la actividad era aproximadamente 176.000  $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{g}$  a 30°C y después de 9 h más la actividad se había incrementado hasta 323.000  $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{g}$ .

(2) 625 g de agua se cargaron al reactor al que se añadía *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164. La mezcla se calentó hasta 25°C. Se alimentaron 375 g de acrilonitrilo al reactor a una velocidad para mantener la concentración en 2% (p/p). Después de 175 minutos la totalidad del acrilonitrilo se había convertido en acrilamida hasta una concentración final de aproximadamente 50% (p/p).

35 (3) Las células procedentes de 2 se recuperaron mediante centrifugación y se suspendieron en 625 g de agua.

Esta suspensión se almacenó a 4°C a lo largo de 3 días antes de recargar al reactor. Se siguió el procedimiento descrito en 5 y, de nuevo, después de 175 minutos, todo el acrilonitrilo se convertía en acrilamida.

(4) Las células procedentes de 3 se trataron según se describe en 3 anteriormente, excepto que se almacenaron a lo largo de 2 días antes de la reutilización. De nuevo, se sintetizaba acrilamida al 50%.

5 Las concentraciones de ácido acrílico medidas para las partidas de acrilamida generadas en el ejemplo 3 2-4)(5-7 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Concentraciones de ácido acrílico medidas en cada una de las partidas de acrilamida

Ejemplo número	Concentración de Ácido Acrílico (ppm)
3-2	5650
3-3	102
3-4	No detectado (<10 ppm)

**Ejemplo 4**

10 (1) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en un fermentador de 280 l que contenía 180 l de medio de cultivo que contenía los siguientes constituyentes (g/l): hidrogenofosfato dipotásico, 0,7; hidrogenofosfato potásico, 0,3; glucosa, 1,0; extracto de levadura, 3,0; heptahidrato de sulfato magnésico, 0,5; hexahidrato de cloruro de cobalto, 0,01; urea, 5,0. El pH del medio se ajustó hasta pH 7,2. El cultivo se hizo crecer a 30°C a lo largo de 3 días.

15 25 l del caldo de fermentación se desgasificaron con nitrógeno a lo largo de 20 minutos antes del almacenamiento a temperatura ambiente, que era aprox. 5°C, a lo largo de 3 ½ días. La actividad de nitrilo hidratasa se midió 15 h después de la recolección y se encontró que era 242.000 U/g a 25°C. Cuando la actividad de NH volvía a medirse 3 días más tarde, se encontró que era 293.000 U/g.

**Ejemplo 5**

20 *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en un matraz Erlenmeyer de 2 l a lo largo de 5 días a 28°C con remoción a 180 rpm en un medio de cultivo que contenía los siguientes constituyentes en g/l: hidrogenofosfato dipotásico, 0,7; hidrogenofosfato potásico, 0,3; glucosa, 10,0; extracto de levadura, 3,0; urea, 5,0; heptahidrato de sulfato magnésico, 0,5; hexahidrato de cloruro de cobalto, 0,01. El pH del medio se ajustó hasta pH 7,2. El caldo de cultivo se dividió en dos porciones, una mitad de las cuales se desoxigenó usando nitrógeno. Las porciones del caldo de cultivo tanto desoxigenado como oxigenado se incubaron a 4, 15 y 25°C a lo largo de 1 semana. La actividad de nitrilo hidratasa de las porciones se midió periódicamente.

25 Los resultados de los ensayos de nitrilo hidratasa se muestran en la Tabla 3. Los resultados se dan en U/mg de células secas.

Tabla 3

Temp. de incubación	Tiempo (días)					
	0	1	2	3	5	7
4°C (O <sub>2</sub> )	140	286		232	267	257
4°C (desgasificado)		274			214	293
15°C (O <sub>2</sub> )						
15°C (desgasificado)	140	218				

(continuación)

Temp. de incubación	Tiempo (días)					
	0	1	2	3	5	7
25°C (O <sub>2</sub> )	140	143				
25°C (desgasificado)		154	230			

5 Puede observarse a partir de los resultados del Ejemplo 5 que el biocatalizador puede almacenarse eficazmente a temperaturas ambiente. Por otra parte, puede observarse que la actividad de nitrilo hidratasa se incrementaba en esta ocasión durante el almacenamiento en comparación con el día cero.

### Ejemplo 6

10 Células descongeladas de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se resuspendieron en agua. La actividad de nitrilo hidratasa se midió durante un período de 1 semana. Las actividades relativas de nitrilo hidratasa medidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Tiempo (días)	Actividad relativa de nitrilo hidratasa (%)		
	4°C	15°C	25°C
0	100	100	100
1	66	64	66
2	78	77	76
5	72	72	74
7	68	74	73

Los resultados de la Tabla 4 muestran que la actividad no disminuía a ninguna de las temperaturas de almacenamiento entre el período de incubación de 1 y 7 días.

### 15 Ejemplo 7

20 (1) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en un matraz Erlenmeyer tabicado de 0,5 l que contenía 100 ml de medio de cultivo que contenía los siguientes constituyentes (g/l): hidrogenofosfato dipotásico, 0,7; hidrogenofosfato potásico, 0,3; glucosa, 10,0; extracto de levadura, 3,0; heptahidrato de sulfato magnésico, 0,5; urea, 5,0; hexahidrato de cloruro de cobalto, 0,01; agua corriente hasta 1 l. El pH del medio se ajustó hasta pH 7,2. El cultivo se hizo crecer a 30°C durante 4 días. La actividad de nitrilo hidratasa se midió a 25°C después de 2, 3 y 4 días de crecimiento.

(2) (a) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en el medio descrito en (1), excepto que la urea se reemplazó por dimetilurea.

25 (b) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en el medio descrito en (1), excepto que la urea se reemplazó por etilurea.

(c) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en el medio descrito en (1), excepto que se añadieron al medio 2,5 g/l de urea y 2,5 g/l de dimetilurea en lugar de los 5 g/l de urea.

## ES 2 376 218 T3

(d) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 se hizo crecer en el medio descrito en (1), excepto que se añadieron 2,5 g/l de urea y 2,5 g/l de etilurea en lugar de los 5 g/l de urea. Las actividades de nitrilo hidratasa se muestran en la Tabla 5

Tabla 5

Compuesto de urea	Actividad de nitrilo hidratasa ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de células secas)		
	2 días	3 días	4 días
Urea	6.800	34.800	123.200
Dimetilurea	14.600	73.800	97.600
Etilurea	14.500	110.100	no determinada.
Urea + dimetilurea	7.400	27.000	19.400
Urea + etilurea	6.000	6.900	73.850

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo que es *Rhodococcus rhodochrous* cepa NCIMB 41164.
2. Un método para cultivar el microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* cepa NCIMB 41164 en un medio de cultivo que contiene urea o un derivado de urea.
- 5 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la urea o el derivado de urea se introduce en el medio de cultivo al menos seis horas después del comienzo del crecimiento del microorganismo.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el medio de cultivo contiene menos de 0,2 g/l de la urea o el derivado de urea durante al menos las 6 primeras horas de cultivo del microorganismo y posteriormente se añade la urea o el derivado de urea al medio de cultivo.
- 10 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el medio de cultivo contiene menos de 0,2 g/l de la urea o el derivado de urea durante al menos las 12 primeras horas de cultivo del microorganismo y posteriormente se añade la urea o el derivado de urea al medio de cultivo.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que la urea o el derivado de urea se añade al medio de cultivo antes de 48 horas de cultivo.
- 15 7. Un procedimiento para preparar una amida a partir del nitrilo correspondiente, en el que el nitrilo se somete a una reacción de hidratación en un medio acuoso en presencia de un biocatalizador que es el microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* cepa NCIMB 41164.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la amida es (met)acrilamida.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el biocatalizador se introduce en un medio acuoso y se alimenta (met)acrilonitrilo al medio acuoso de modo que la concentración de (met)acrilonitrilo en el medio acuoso se mantenga hasta 6% en peso.
- 20 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la reacción continúa hasta que la concentración de acrilamida está entre 30 y 55% en peso.
11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el biocatalizador se recicla y se reutiliza.
- 25 12. Un método para mejorar la actividad biocatalítica del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo se cultiva en un medio de cultivo que comprende urea o un derivado de urea, en el que la urea o el derivado de urea se introduce en el medio de cultivo al menos 6 horas después del comienzo del crecimiento del microorganismo.
- 30 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el medio de cultivo contiene menos de 0,2 g/l de la urea o el derivado de urea durante al menos las 6 primeras horas de cultivo del microorganismo y posteriormente se añade la urea o el derivado de urea al medio de cultivo.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el medio de cultivo contiene menos de 0,2 g/l de la urea o el derivado de urea durante al menos las 12 primeras horas de cultivo del microorganismo y posteriormente se añade la urea o el derivado de urea al medio de cultivo.
- 35 15. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la urea o el derivado de urea se añade al medio de cultivo antes de 48 horas de cultivo.
16. Una composición acuosa que comprende un biocatalizador que es el microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* cepa NCIMB 41164 y en la que el biocatalizador está en la forma de un microorganismo de células libres que crece no activamente.
- 40 17. Un método para almacenar el biocatalizador que es el microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* cepa NCIMB 41164 en la forma de un microorganismo de células libres que crece no activamente, en un medio de almacenamiento acuoso.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el biocatalizador se almacena a una temperatura por encima de su punto de congelación, preferiblemente por encima de 0°C y más preferiblemente entre 4 y 3 0°C.
- 45

19. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que el biocatalizador se almacena durante un período de al menos dos días, preferiblemente entre 3 y 28 días y más preferiblemente entre 5 y 14 días.