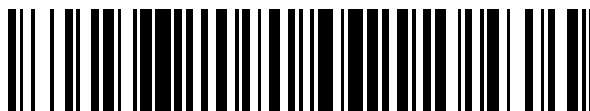


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 816**

51 Int. Cl.:

**C08F 2/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2004 E 04798045 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1689790**

54 Título: **Procedimiento de producción polímeros**

30 Prioridad:

**02.12.2003 GB 0327901**

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

**04.11.2014**

73 Titular/es:

**CIBA SPECIALTY CHEMICALS WATER  
TREATMENTS LIMITED (100.0%)  
CLECKHEATON ROAD, LOW MOOR  
BRADFORD, WEST YORKSHIRE BD12 0JZ, GB**

72 Inventor/es:

**GREENHALGH, STUART;  
SYMES, KENNETH CHARLES;  
ARMITAGE, YVONNE;  
HUGHES, JONATHAN y  
RICHARDSON, GARY**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 517 816 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

Procedimiento de producción polímeros

La presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación polímeros de un monómero etilénicamente insaturado, monómero que es (met)acrilamida. En particular, la invención se refiere a procedimientos en los que los monómeros etilénicamente insaturados se fabrican usando un biocatalizador.

Es bien conocido cómo emplear biocatalizadores, tales como microorganismos que contienen enzimas para realizar reacciones químicas, o el uso de enzimas que están libres de microorganismos. Es conocido que diversos monómeros etilénicamente insaturados pueden prepararse convirtiendo un material de partida de sustrato en el monómero deseado mediante el uso de un biocatalizador.

Es conocido que las enzimas nitrilo hidratasa catalizan la hidratación de nitrilos directamente a las amidas correspondientes. Típicamente las enzimas nitrilo hidratasa pueden sintetizarse por una diversidad de microorganismos, por ejemplo microorganismos de los géneros Bacillus, Bacteridium, Micrococcus, Brevibacterium, Corynebacterium, Pseudomonas, Acinetobacter, Xanthobacter, Streptomyces, Rhizobium, Klebsiella, Enterobacter, Erwinia, Aeromonas, Citrobacter, Achromobacter, Agrobacterium, Pseudonocardia, Rhodococcus y Comamonas.

Se ha descrito ampliamente sobre lo relacionado con la síntesis de nitrilo hidratasa dentro de microorganismos. Arnaud y col., Agric. Biol. Chem. 41: (11) 2183-2191 (1977) describen la característica de una enzima a la que hacen referencia como "acetonitrilasa" a partir de Brevibacterium sp R312 que degrada el acetonitrilo a acetato mediante el intermedio amida. Asano y col., Agric. Biol. Chem. 46: (5) 1183-1189 (1982) aislaron Pseudomonas chlororaphis B23 que producía nitrilo hidratasa para catalizar la conversión de acrilonitrilo a acrilamida, generando 400 g/l de acrilamida.

Se ha encontrado que diversas cepas de las especies Rhodococcus rhodochrous producen muy eficazmente la enzima nitrilo hidratasa. El documento EP-0 307 926 describe el cultivo de Rhodococcus rhodochrous, específicamente la cepa J1 en un medio de cultivo que contiene iones cobalto. La nitrilo hidratasa puede usarse para hidratar nitrilos en amidas y en particular la conversión de 3-cianopiridina en nicotinamida. En una realización, se produce una amida en un medio de cultivo del microorganismo en el cual está presente un nitrilo sustrato. En otra realización, se añade un nitrilo sustrato al medio de cultivo en el que la nitrilo hidratasa se ha acumulado para realizar la reacción de hidratación. También hay una descripción del aislamiento de células de microorganismos y soportarlas en un soporte adecuado por ejemplo por inmovilización, y después poniéndolas en contacto con un sustrato. Rhodococcus rhodochrous J1, se usa también comercialmente para fabricar monómero de acrilamida a partir de acrilonitrilo y este procedimiento se ha descrito por Nagasawa y Yamada Pure Appl. Chem. 67: 1241-1256 (1995). El documento EP-A-0362829 describe un procedimiento para cultivar bacterias de la especie Rhodococcus rhodochrous que comprende al menos uno de urea e ión cobalto para preparar las células de Rhodococcus rhodochrous que tienen actividad nitrilo hidratasa. Se describe específicamente el Rhodococcus rhodochrous J1.

Leonova y col., Appl. Biochem. Biotechnol. 88: 231-241 (2000) titulado "Nitrile Hydratase of Rhodococcus", describen el crecimiento y síntesis de nitrilo hidratasa en Rhodococcus rhodochrous M8. La síntesis de NH de esta cepa está inducida por urea en el medio, que también se usa como una fuente de nitrógeno para el crecimiento mediante este organismo. Se requiere también cobalto para una alta actividad de nitrilo hidratasa. El presente documento bibliográfico tiene la inducción y los efectos metabólicos como su objetivo principal.

Leonova y col., Appl. Biochem. Biotechnol. 88: 231-241 (2000) indican también que la acrilamida se produce comercialmente en Rusia usando Rhodococcus rhodochrous M8. La patente Rusa 1731814 describe la cepa M8 de Rhodococcus rhodochrous.

La cepa M33 de Rhodococcus rhodochrous, que produce nitrilo hidratasa sin necesidad de un inductor tal como urea, se describe en el documento US-A-5827699. Esta cepa de microorganismos es un derivado de Rhodococcus rhodochrous M8.

La producción de un monómero de acrilamida, en particular, es deseable mediante la ruta biocatalítica. En la publicación de revisión 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 de un desarrollo de una ruta biocatalítica para la obtención de acrilamida. Se describen con cierto detalle tres catalizadores sucesivamente mejores y sus características para la producción de acrilamida y, en particular, el catalizador de tercera generación Rhodococcus rhodochrous J1.

Se sabe también como producir acrilato de amonio directamente a partir de acrilonitrilo por la acción de una enzima nitrilasa. El documento WO-A-9721827 describe la producción de una solución concentrada de (met)acrilato de amonio que está sustancialmente libre de (met)acrilonitrilo mediante hidrólisis enzimática de (met)acrilonitrilo en presencia de agua usando una enzima nitrilasa que tiene una Km para (met)acrilonitrilo por debajo de 500 micro moles y una Ki para (met)acrilato de amonio por encima de 100.000 micro moles. La enzima puede obtenerse a partir de un microorganismo Rhodococcus rhodochrous.

Nagasawa y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 322-324 (1990) también describen el uso de la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 para la síntesis de ácido acrílico y metacrílico. Buscaron los efectos de temperatura, concentración de acrilonitrilo y condiciones de pH sobre la reacción.

5 La nitrilasa se ha usado también para catalizar la hidrólisis selectiva de dinitrilos, como se describe por Bengis-Garber y Gutman en Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 11-16 (1989). Su organismo *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 se usó para convertir selectivamente, en particular, fumaronitrilo a ácido 3-cianoacrílico.

10 El uso de una combinación de nitrilo hidratasa y amidasa a menudo se ha descrito para la formación de ácido carboxílico a partir del nitrilo correspondiente. Por ejemplo, el documento US-A-2003/0148480 describe el uso de nitrilo hidratasa y amidas de *Comamonas testosteroni* 5-MGAM-4D para la formación de ácido acrílico y metacrílico con altos rendimientos y especificidades obteniéndose.

Es la práctica común retirar las células biocatalíticas del medio de crecimiento antes de usar la biomasa para producir los monómeros para evitar la contaminación del monómero con impurezas que podrían afectar negativamente a la polimerización exitosa del monómero.

15 Se acepta, en general, que incluso pequeñas cantidades de impurezas pueden afectar a la polimerización de los monómeros o evitar la polimerización que está teniendo lugar. Por ejemplo, los sistemas iniciadores usados para la polimerización se usan en pequeñas cantidades y, por lo tanto, se requerirían solo pequeñas cantidades de impurezas para inactivarlos, deteniendo o casi deteniendo la polimerización. Tales impurezas pueden dar como resultado ramificación, reticulación, terminación de cadenas u otros efectos sobre el polímero. Aunque se sabe cómo introducir a propósito pequeñas cantidades de sustancias específicas para inducir la transferencia de cadenas, ramificación o reticulación durante la polimerización, estas sustancias se introducen de una manera controlada en un monómero por lo demás sustancialmente puro para ocasionar una estructura molecular particular. Los recientes desarrollos en las técnicas de polimerización han hecho posible partir de monómeros esencialmente puros e introducir cantidades traza de aditivos químicos para formar polímeros que presentan pesos moleculares extremadamente altos o polímeros que tienen una estructura molecular particular. En consecuencia, es posible proporcionar polímeros que presentan propiedades que son particularmente adecuadas para aplicaciones específicas, por ejemplo deshidratación de sólidos suspendidos para proporcionar una torta de sólidos mejorada o en el campo de la fabricación de papel una combinación mejorada de retención, drenaje y formación.

20 Se sabe cómo polimerizar monómeros etilénicamente insaturados en presencia de un biocatalizador. Por ejemplo, se sabe a partir del documento WO-A-92/05205 que las poli(acrilamidas) con niveles reducidos de acrilamida libre pueden prepararse introduciendo una enzima amidasa en la mezcla de monómeros antes de la polimerización. En este procedimiento, las células microbianas que contienen amidasa se separan del caldo de fermentación. El biocatalizador de amidasa no está incluido en la etapa biocatalítica que forma el monómero, sino que se añade en una etapa diferente. Se usó una suspensión de amidasa en cantidades relativamente pequeñas de manera que se retiraron los niveles residuales de acrilamida en el polímero formado. El procedimiento de polimerización empleaba niveles relativamente altos de iniciador y se formaron polímeros de bajo peso molecular que se usaron para la estabilización del suelo.

30 El documento WO-A-97/06248 describe un procedimiento para la producción de amidasa o nitrilasa de alta estabilidad usando un cultivo continuo con limitación de carbono usando una fuente de carbono que incluye, respectivamente, uno cualquiera de amida o nitrilo. La amidasa preparada por este procedimiento es eficaz para convertir la (met)acrilamida en (met)acrilato de amonio y, por ejemplo, puede añadirse durante o después de la polimerización de acrilamida. Por lo tanto, la amidasa se combina con el monómero (met)acrilamida para formar el monómero acrilato de amonio o la amidasa se combina con poli (met)acrilamida para convertir la (met)acrilamida libre residual en los polímeros en (met)acrilato de amonio. También se desvela la combinación de la enzima amidasa y/o el microorganismo en la mezcla polimerizable que contiene acrilamida y después la polimerización para formar el polímero, y en el que el contenido de (met)acrilamida residual es reducido. En este procedimiento el biocatalizador amidasa no forma el monómero que se va a polimerizar sino que se añade en una etapa diferente.

35 Por su naturaleza propia, las impurezas tienden a ser variables y dan lugar a efectos indeseados, normalmente inesperados, en el polímero. Incluso pequeñas cantidades de tales impurezas pueden afectar negativamente a la estructura molecular del polímero y, en tales circunstancias, harían que el producto polimérico sea inadecuado para la aplicación pretendida.

40 Es por lo tanto una práctica común evitar la presencia de contaminantes en monómeros que se van a polimerizar para evitar cambios en la estructura molecular pretendida y las propiedades del polímero. Esto es cierto siempre y cuando el monómero se haya fabricado usando un catalizador o biocatalizador sintético. Sin embargo, la fabricación biológica de monómeros presenta un mayor riesgo de contaminación a partir del material celular y el caldo de fermentación.

45 Los contaminantes que normalmente deberán evitarse incluyen azúcares, aminoácidos, sales metálicas y polisacáridos, proteínas y otros productos orgánicos presentes, ya sea del medio usado para generar la biomasa o como medio agotado, o como un metabolito a partir de las células crecientes o la presencia del propio material

celular o productos de degradación que surgen de la lisis y degradación celular.

5 El documento WO-A-02/088372 describe un procedimiento y un dispositivo para producir una solución acuosa de acrilamida usando un biocatalizador. El procedimiento implica un procedimiento de separación para retirar el biocatalizador del producto de acrilamida. Este procedimiento implica el uso de una centrífuga y, opcionalmente, en combinación con floculación para retirar el biocatalizador. El biocatalizador se lava con agua para retirar el monómero residual y el agua se usa después en la siguiente reacción de bioconversión.

Maestracci y col., Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 36: 69-115 (1988) describen el uso de *Brevibacterium* sp R312 para convertir  $\alpha$ -aminonitrilos en sus aminoácidos correspondientes. Los productos se separaron por técnicas bien conocidas incluyendo retirada de las células por centrifugación, seguido de cristalización.

10 Nagasawa y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 322-324 (1990) se refiere a la producción de ácido acrílico y ácido metacrílico usando nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1. La reacción usaba células enteras de J1 en una solución de tampón a la que se introdujo el acrilonitrilo. El presente documento informa de que se consiguió un 39 % de ácido acrílico. La mezcla de reacción se centrifugó para retirar las células y el ácido acrílico y el ácido metacrílico se aislaron de la mezcla de reacción usando éter dietílico.

15 El documento US 4343900 desvela un procedimiento para preparar acrilamida a partir de acrilonitrilo en un medio acuoso usando células atrapadas en gel que tenían actividad nitrilásica, en el que se añade un 0,01-0,5 % de un carbonato de metal alcalino o bicarbonato y opcionalmente un ácido orgánico al medio acuoso usando de esta manera la inhibición del hinchamiento de las células fijas, manteniendo la actividad enzimática y obteniendo una solución de acrilamida que tiene una alta calidad.

20 El documento US-A-5698029 desvela un procedimiento para preparar una emulsión polimérica de tipo agua en aceite basada en acrilamida que se obtiene a partir de acrilonitrilo usando células lavadas y posteriormente inmovilizadas de, por ejemplo, *Rhodococcus rhodochrous* J1 como biocatalizador. La retirada, filtración y concentración del biocatalizador produce una solución acuosa de acrilamida al 50 % que se polimeriza.

25 El documento WO-A-03/033716 desvela un procedimiento para preparar polímeros basados en acrilamida, en los que la acrilamida que tiene una cantidad de monosacárido de  $\leq 500$  ppm se prepara a partir de acrilonitrilo usando un catalizador microbiano productor de nitrilo hidratasa que tiene una cantidad de monosacárido  $\leq 5$  % en peso. Dicha cantidad se obtiene, por ejemplo, a partir de un cultivo de microorganismos productores de nitrilo hidratasa lavando el líquido microbiano.

30 El documento WO-A-03/080680 desvela un procedimiento para preparar un polímero de una solución acuosa de acrilamida (que contiene de 0,1 a 100 mg de sacárido) producido a partir de acrilonitrilo con el uso de un biocatalizador que tiene actividad nitrilo hidratasa. En particular, se prepara una solución acuosa de una cantidad específica de sacárido que contiene acrilamida con una suspensión celular obtenida a partir de un producto de cultivo centrifugado y lavado derivado de *Rhodococcus rhodochrous* J1. La solución de acrilamida obtenida, después de que las células se separan, se diluye hasta una concentración del 15 % en peso y se polimeriza por polimerización en solución produciendo una solución de polímero que tiene una mayor viscosidad que una solución de poli(acrilamida) correspondiente que no contiene sacárido.

35 La retirada del biocatalizador, es decir, en forma de células microbianas, ya sean células enteras o como parte del material celular; este podría estar en forma de células no alteradas y sus contenidos y medio de suspensión, enzimas parcialmente purificadas o enzimas purificadas, y materiales de fermentación asociados, no obstante, del monómero, requieren el procesamiento adicional que puede ser costoso y consumir tiempo. En consecuencia, sería deseable proporcionar de una manera más rentable productos poliméricos que presenten elementos o características diseñadas específicamente usando un monómero producido biológicamente.

40 De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para preparar un polímero de un monómero etilénicamente insaturado, monómero que es (met)acrilamida, en el que el monómero se obtiene a partir de una reacción biocatalizada, en el que el monómero etilénicamente saturado se prepara proporcionando un sustrato que puede convertirse en el monómero etilénicamente insaturado, sustrato que es (met)acrilonitrilo, poner en contacto un sustrato con un biocatalizador, biocatalizador que comprende material celular en forma de células enteras o células fracturadas y caldo de fermentación y, de esta manera, convertir el sustrato en el monómero etilénicamente insaturado en presencia del material celular y el caldo de fermentación, biocatalizador que comprende una enzima nitrilo hidratasa, formar el polímero por polimerización del monómero etilénicamente insaturado o una mezcla monomérica que comprende el monómero etilénicamente insaturado, en el que no hay retirada del material celular y el caldo de fermentación del monómero etilénicamente insaturado.

55 El biocatalizador comprende, convenientemente, un microorganismo, y el procedimiento puede realizarse dentro o fuera de la célula del microorganismo. En los casos donde el procedimiento se realiza dentro de la célula, este procedimiento puede estar en forma de una única enzima intracelular que realiza la etapa biocatalítica, o el

procedimiento puede formar parte de una ruta metabólica del microorganismo y, por tanto, puede implicar varias etapas biocatalíticas para generar el monómero etilénicamente insaturado.

Los inventores han encontrado que es posible fabricar polímeros que tienen características y propiedades diseñadas específicamente sin necesidad de retirar el biocatalizador o el caldo de fermentación. Por biocatalizador se entiende células microbianas enteras que contienen la actividad biocatalítica; células microbianas parciales; material celular microbiano tal como células alteradas en un medio de suspensión y sus contenidos; enzimas parcialmente purificadas y enzimas purificadas; células microbianas enteras o células microbianas parciales o enzimas en un medio de fermentación; o en otro medio de suspensión adecuado tal como agua o un medio de suspensión fisiológicamente compatible. En lo que sigue en la presente memoria, el término biocatalizador se refiere a células microbianas y material celular como se describe aquí y a cualquier otra forma de biocatalizador que se sabe que constituye una enzima y cualquier material celular asociado presente con la enzima que puede requerirse o no para permitir la actividad biocatalítica. Adicionalmente, el procedimiento posibilita que los monómeros etilénicamente saturados se fabriquen usando un biocatalizador, lo que da como resultado convenientemente una alta conversión del compuesto sustrato para formar monómero con un alto rendimiento presentando concentraciones muy bajas del compuesto sustrato o subproductos. Generalmente, sería de esperar que la presencia del biocatalizador o el caldo de fermentación tuviera un efecto perjudicial sobre la polimerización y el producto polimérico final que se forma. Sin embargo, al contrario de estas expectativas la polimerización del monómero en presencia del biocatalizador o el caldo de fermentación da como resultado polímeros deseados sin ningún deterioro.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención sería posible evitar la retirada del biocatalizador y el caldo de fermentación. Por lo tanto, sería posible evitar la separación del biocatalizador del caldo de fermentación de manera que el monómero se polimerice en presencia tanto del biocatalizador como del caldo de fermentación. No se retira ni el biocatalizador ni el caldo de fermentación del monómero antes de la polimerización.

En consecuencia, el procedimiento evitaría entonces la etapa de procesamiento que se requería para retirar el biocatalizador del caldo de fermentación antes de fabricar el monómero de una calidad adecuada y, de hecho, usando el monómero en la fabricación de polímeros de calidad comercial. Adicionalmente, el procedimiento evita preferentemente la etapa de retirar el biocatalizador del monómero antes de la polimerización.

En consecuencia, el procedimiento de la presente invención puede evitar la necesidad de un equipo de separación caro para la retirada del biocatalizador: ya sean células microbianas enteras o fracturadas, como se ha descrito anteriormente, que pueden usarse para retirar el catalizador del caldo de fermentación o para la retirada del catalizador después de que el producto monomérico se haya preparado. Adicionalmente, no habría necesidad de purificar el monómero antes de la polimerización.

El biocatalizador debería ser capaz de convertir un sustrato en el monómero deseado. Generalmente, sería un microorganismo que es capaz de generar enzimas adecuadas para la conversión de interés. Por ejemplo, este podría ser un microorganismo seleccionado entre un amplio número de géneros microbianos. Estos podrían incluir, aunque no se restringe a los microorganismos seleccionados entre los géneros *Bacillus*, *Bacteridium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthobacter*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Comamonas*, *Saccharomyces*, *Dietzia*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Agrobacterium*, *Mycobacterium*, *Methylophilus*, *Propionibacterium*, *Actinobacillus*, *Megasphaera*, *Aspergillus*, *Candida* y *Fusarium*. Los microorganismos preferidos incluyen aquellos que son capaces de producir enzimas que convierten los nitrilos en las amidas correspondientes. Los microorganismos particularmente preferidos son aquellos que pueden producir una nitrilo hidratasa adecuada para convertir (met)acrilonitrilo en (met)acrilamida, por ejemplo aquellos del género *Rhodococcus* especialmente la especie *Rhodococcus rhodochrous*. Un biocatalizador particularmente adecuado es la nueva cepa de *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 que se describe y reivindica en nuestra solicitud de patente RU presentada conjuntamente 0327907.2, presentada el 2 de diciembre de 2003, a la que se ha asignado el número de expediente de referencia BT/3-22351/P2.

Cepa NCIMB 41164 de *Rhodococcus rhodochrous*

#### 1. Origen y deposición

La cepa fue aislada por propios inventores del suelo 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 acceso NCIMB 41164 según el Tratado de Budapest.

#### 2. Características morfológicas y de cultivo

- (1) Crecimiento polimórfico
- (2) Motilidad: inmóvil
- (3) No formadora de esporas
- (4) Gram positiva
- (5) Aerobia
- (6) Crecimiento sobre nutriente de agar da colonias redondeadas de color rosa asalmonado en 48 horas a 30 °C.

El biocatalizador comprende material celular en forma de células enteras o células fracturadas y comprende caldo de fermentación. El material celular puede incluir cualquiera de los constituyentes de una célula microbiana, por ejemplo, incluyendo material de la pared celular, material de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN), citoplasma o proteínas. En general, la presencia de material celular en el monómero será de al menos el 0,001 % en peso y normalmente de al menos el 0,005 % en peso.

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. Los 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, estos podrían incluir monosacáridos o disacáridos como azúcares; sales de amonio u otras fuentes de nitrógeno; sales inorgánicas tales como fosfatos, sulfatos, magnesio, calcio, sodio y sales de potasio; compuestos metálicos; vitaminas y componentes de medio de fermentación complejos, por ejemplo licor de maceración de maíz; peptona; extracto de levadura, compuestos orgánicos o inorgánicos que pueden usarse para requisitos de crecimiento microbiano específicos; inductores de enzima específicos; y ácidos orgánicos tales como citrato o piruvato; y cualquier otro compuesto orgánico o inorgánico que pueda requerirse para asegurar un crecimiento exitoso de los microorganismos específicos.

El monómero etilénicamente insaturado puede ser cualquiera de estas sustancias que puede prepararse biológicamente a partir de un material de partida o sustancia específica que se denomina sustrato. También preferentemente el monómero etilénicamente insaturado es soluble en agua. Por soluble en agua se entiende que el monómero tiene una solubilidad de al menos 5 g por 100 ml a 25 °C. El monómero etilénicamente insaturado es acrilamida o metacrilamida.

El monómero etilénicamente insaturado puede usarse en el procedimiento en solitario para formar el homopolímero o puede mezclarse con otros monómeros etilénicamente insaturados para formar una mezcla de monómeros que se polimeriza para formar un copolímero del monómero etilénicamente insaturado. Puede usarse cualquier comonómero adecuado para este fin. Especialmente cuando el monómero etilénicamente insaturado es soluble en agua. El comonómero convenientemente debe de ser soluble en agua o potencialmente soluble en agua, tal como anhídridos. Los comonómeros típicos incluyen (met)acrilamida, ácido (met)acrílico (o sales), ácido itacónico (o sales), ácido maleico (o sales), anhídrido maleico, ácido vinil sulfónico (o sales), ácido alil sulfónico (o sales), ácido 2-acrilamido-2-metil propano sulfónico (o sales), (met)acrilato de dimetil amino etilo (o sales de amonio cuaternario), (met)acrilamida de dimetil amino propilo (o sales de amonio cuaternario), N-vinil pirrolidona, N-vinil formamida, acetato de vinilo, acrilonitrilo, ésteres (met)acrílicos de alcoholes C<sub>1-30</sub>. Las sales de los monómeros de ácido indicadas anteriormente pueden ser de cualquier catión adecuado pero preferentemente sales de metal alcalino o de amonio.

El procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado para preparar polímeros solubles en agua o hinchables con agua de alto peso molecular. Los polímeros pueden ser, por ejemplo, lineales, ramificados o reticulados. Preferentemente, los polímeros son de alto peso molecular y sustancialmente solubles en agua, presentando una viscosidad intrínseca (VI) de al menos 3 dl/g (medida usando un viscosímetro de nivel suspendido en cloruro sódico 1 M a 25 °C). Normalmente, los polímeros tendrán viscosidades intrínsecas de al menos 4 dl/g y generalmente significativamente mayores, por ejemplo de al menos 7 u 8 dl/g. En muchos casos, los primeros tendrán una VI de al menos 10 o 12 dl/g y podría tan alta como 20 o 30 dl/g.

El polímero soluble en agua o hinchable en agua preparado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede ser catiónico, aniónico, no iónico o anfótero. Puede ser sustancialmente lineal o, como alternativa, ramificado o reticulado. Los polímeros reticulados o ramificados se preparan incorporando un agente de ramificación o reticulación en la mezcla de monómero. El agente de reticulación o ramificación puede ser, por ejemplo, un material di- o multifuncional que reacciona con los grupos multifuncionales colgantes en la cadena polimérica, por ejemplo, iones metálicos multivalentes o compuestos de amina que pueden reaccionar con los grupos carboxílicos colgantes. Preferentemente, sin embargo, el agente de reticulación o ramificación será un compuesto polietilénicamente insaturado que se polimeriza en dos o más cadenas de polímeros. Típicamente, tales agentes de reticulación incluyen metilen bis acrilamida, cloruro de tetra alil amonio, trialil amina y diacrilato de polietilenglicol. Los polímeros pueden estar altamente reticulados y, por lo tanto, ser insolubles en agua pero hinchables con agua. Como alternativa, el polímero puede ser soluble en agua y sustancialmente lineal o ligeramente ramificado, por ejemplo, preparado usando menos de 10 ppm de monómero de reticulación/ramificación.

Los polímeros particularmente preferidos preparados por el procedimiento de la invención incluyen homopolímeros o copolímeros de acrilamida o metacrilamida. Convenientemente, los copolímeros incluyen cualquiera de los comonómeros indicados anteriormente, aunque preferentemente es un copolímero de acrilamida con acrilato sódico o un copolímero de acrilamida con amonio cuaternario y sales de ácido de (met)acrilato de dimetilaminoetilo. Los homo- o copolímeros de acrilamida especialmente preferidos son de alto peso molecular y presentan una alta viscosidad intrínseca como se ha definido anteriormente.

El polímero generalmente se forma sometiendo el monómero etilénicamente insaturado o una mezcla de monómeros que comprenden el monómero etilénicamente insaturado a condiciones de polimerización. Esto puede

conseguirse por calentamiento o irradiación, por ejemplo usando luz ultravioleta. Los iniciadores de polimerización preferentemente se introducen en el monómero o mezcla de monómeros para iniciar la polimerización. Convenientemente, esto puede conseguirse mediante el uso de iniciadores redox y/o iniciadores térmicos. Los iniciadores redox típicamente incluyen un agente reductor, tal como sulfito sódico, dióxido de azufre y un compuesto oxidante tal como persulfato de amonio o un compuesto peroxi adecuado, tal como hidroperóxido de butilo terciario etc. La iniciación redox puede emplear hasta 10.000 ppm (basado en el peso de monómero) de cada componente del par redox. Preferentemente, aunque cada componente del par redox a menudo es menor de 1000 ppm, típicamente está en el intervalo de 1 a 100 ppm, normalmente en el intervalo de 4 a 50 ppm. La relación de agente reductor a agente oxidante puede ser de 10:1 a 1:10, preferentemente en el intervalo de 5:1 a 1:5, más preferentemente 2:1 a 1:2 por ejemplo aproximadamente 1:1.

La polimerización puede efectuarse también empleando un iniciador térmico en solitario o en combinación con otros sistemas iniciadores, por ejemplo iniciadores redox. Los iniciadores térmicos incluirían cualquier compuesto iniciador adecuado que libera radicales a una temperatura elevada, por ejemplo compuestos azo tales como azobisisobutironitrilo (AZDN), ácido 4,4'-azobis-(4-cianoaléico) (ACVA). Se usan iniciadores térmicos típicamente en una cantidad de hasta 10.000 ppm, basándose en el peso del monómero. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los iniciadores térmicos se usan en el intervalo de 100 a 5.000 ppm, preferentemente de 200 a 2.000 ppm, normalmente aproximadamente 1.000 ppm.

Típicamente, una solución acuosa de monómero soluble en agua puede polimerizarse por polimerización en solución para proporcionar un gel acuoso, o por polimerización en fase inversa, en la que una solución de monómero se suspende en un líquido inmiscible en agua y se polimeriza para formar perlas poliméricas o, como alternativa, emulsionando un monómero acuoso en un líquido orgánico y después efectuando la polimerización. Los ejemplos de polimerización en fase inversa se dan en los documentos EP-A-150933, EP-A-102160 o EP-A-126528.

En un aspecto adicional de la invención, el monómero etilénicamente insaturado puede producirse mediante el biocatalizador, opcionalmente mezclado con otros monómeros y después polimerizado *in situ* para formar el polímero. En consecuencia, el monómero etilénicamente insaturado puede producirse y después polimerizarse en el mismo recipiente. De esta manera, el monómero etilénicamente insaturado se produce a partir del sustrato en un recipiente, y opcionalmente se introducen otros monómeros en el recipiente para formar una mezcla monomérica. El monómero etilénicamente insaturado o la mezcla de monómeros se somete después a condiciones de polimerización, opcionalmente introduciendo iniciadores en el recipiente y, de esta manera, formando el polímero dentro del recipiente. Adicionalmente, el procedimiento puede adaptarse más convenientemente para producir el biocatalizador en el mismo recipiente introduciendo el sustrato en el recipiente que después se convierte en el monómero etilénicamente insaturado y después se polimeriza en el mismo recipiente para formar el polímero como se ha definido anteriormente.

De esta manera, el procedimiento de la presente invención proporciona las ventajas de evitar la necesidad de retirar las células, material celular o material proteico del caldo catalítico o de retirar las impurezas o material celular del monómero. Adicionalmente, el producto preparado mediante este procedimiento es una composición novedosa.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

**Ejemplo 1 (no inventivo)**

- (1) Se cultivan *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus terreus* en un caldo de nutrientes a 30 °C hasta que alcanzan la fase exponencial tardía de crecimiento. El caldo de cultivo resultante se centrifuga para retirar la biomasa y dejar un sobrenadante.
- (2) Se prepara una solución de acrilamida al 25 %. Se añaden 10 ppm de hidrofosfito sódico y 1000 ppm de hidrogenoperóxido de butilo terciario a la solución. El pH se ajusta a 4,0 usando ácido acético. La solución se desgasifica y se añaden 1000 ppm de sulfato amónico ferroso, momento después del cual se forma un polímero.
- (3) Se repite el procedimiento en (2) usando un sobrenadante del cultivo de los organismos descrito en (1) para preparar una solución de acrilamida en lugar de agua. El peso molecular de los polímeros en solución resultante se mide y se compara con un polímero que se ha preparado usando agua para preparar la solución de acrilamida. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Los pesos moleculares de los polímeros eran todos prácticamente iguales.

Tabla 1

Microorganismo para la fuente de sobrenadante	Peso molecular
Control (ninguno)	245.600
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	231.700
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	243.600
<i>Aspergillus terreus</i>	248.100

**Ejemplo 2**

(1) Se cultiva *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 en un fermentador de 280 l que contenía 180 l de medio de cultivo que contenía los siguientes constituyentes (g/l): hidrogenofosfato de dipotasio 0,7; hidrogenofosfato de potasio 0,3; glucosa 1,0; urea, 5,0; extracto de levadura; extracto de levadura 3,0; sulfato de magnesio heptahidrato 0,5; cloruro de cobalto 0,01;. El pH del medio se ajusta a pH 7,2. El cultivo se desarrolla a 30 °C durante 3 días. Se alimenta también glucosa al cultivo periódicamente. La actividad nitrilo hidratasa del caldo de fermentación se mide 15 horas después de la recolección y se encuentra que es de 242.000 U/g a 25 °C (700.000 U/l).

(2) Se mezclan 15 l del caldo de fermentación de (1) con 35 l de agua de procedimiento, esta suspensión se carga después en un reactor de 600 l que contenía 250 kg de agua. Se alimenta acrilonitrilo al reactor durante un periodo de varias horas hasta que se consigue una concentración de acrilamida del 46,8 %. Se centrifugan 25 kg de la solución de acrilamida para retirar el biocatalizador. No se centrifugaron 25 kg de la acrilamida para retirar el biocatalizador.

(3) Las muestras de acrilamida centrifugada y no centrifugada de (2) se polimerizan como homopolímeros usando iniciadores redox y térmicos para dar polímeros en gel con una VI de aprox. 17 dl/g. La viscosidad en cP se mide también y no hay diferencia en las muestras preparadas usando acrilamida tanto centrifugada como no centrifugada. Los resultados de las mediciones de viscosidad de los polímeros (cP) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Acrilamida centrifugada	Viscosidad(cP)				
	Patrón	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
	28	32	37	28	27
Acrilamida que contiene caldo de fermentación	Patrón	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8
	28	29	28	27	26
La especificación para la viscosidad es 25-40 cP a una velocidad de cizalladura de 250 s <sup>-1</sup>					

(4) Los polímeros preparados en (3) se ensayan como floculantes a dosis de 16-28 mg/l usando una arcilla china al 4 % a un pH de 2 como un sustrato. Las tasas de sedimentación se muestran en la Tabla 3. No se observaron diferencias en los rendimientos de polímero cuando se comparó con la especificación para la muestra de acrilamida patrón.

Tabla 3

Número de lote	Tasa de sedimentación (cm/min)			
	Dosis de polímero (mg/l)			
	16	20	24	28
Patrón	35,5	42,2	49,2	56,2
2	30,4	39,2	45,3	50,8
3	36,6	39,5	53,3	60,0
5	43,6	46,6	56,4	70,6
7	31,0	36,0	43,4	43,8

**Ejemplo 3**

Se preparó una solución de acrilamida al 30 % (p/p) que contenía hasta un 20 % en peso de caldo de fermentación del microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164. La acrilamida dopada con caldo de fermentación se polimeriza como un homopolímero usando iniciadores redox y térmicos para formar un polímero de gel con una VI de aprox. 17 dl/g. Los resultados de las mediciones de viscosidad VI de 1 punto para cada una de las soluciones de polímero se muestran en la Tabla 4. Los resultados de viscosidad están todos dentro de la especificación indicada para este polímero.



Tabla 4

Concentración del Caldo de Fermentación	VI (dl/g)
0	16,9
5	16,5
10	17,6
15	17,2
20	17,9

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de preparación de un polímero de un monómero etilénicamente insaturado, monómero que es (met)acrilamida, en el que el monómero se obtiene a partir de una reacción biocatalizada, en el que el monómero etilénicamente insaturado se prepara proporcionando un sustrato que puede convertirse en el monómero etilénicamente insaturado, dicho sustrato es (met)acrilonitrilo, poniendo en contacto el sustrato con un biocatalizador, dicho biocatalizador comprende material celular en forma de células enteras o células fracturadas y caldo de fermentación y convirtiendo de esta manera el sustrato en el monómero etilénicamente insaturado en presencia del material celular y el caldo de fermentación, dicho biocatalizador comprende una enzima nitrilo hidratasa, formando el polímero por polimerización del monómero etilénicamente insaturado o una mezcla de monómeros que comprende el monómero etilénicamente insaturado, en el que no hay retirada del material celular y el caldo de fermentación del monómero etilénicamente insaturado.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material celular comprende células enteras.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el material celular comprende material celular fracturado.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el material celular fracturado es seleccionado del grupo que consiste en material de la pared celular, material de la membrana celular, material del núcleo celular, citoplasma y proteínas.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polímero es un polímero de alto peso molecular soluble en agua que presenta una viscosidad intrínseca (VI) de al menos 3 dl/g (medida usando un viscosímetro de nivel suspendido en cloruro sódico 1 M a 25 °C).
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polímero es un homopolímero o copolímero de (met)acrilamida.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sustrato es introducido en un recipiente y puesto en contacto con el biocatalizador y en el que el sustrato es convertido en el monómero etilénicamente insaturado, opcionalmente otros monómeros son introducidos en el recipiente para formar una mezcla monomérica, el monómero etilénicamente insaturado o mezcla de monómeros es sometido a condiciones de polimerización, introduciendo opcionalmente los iniciadores en el recipiente y, de esta manera, formar el polímero dentro del recipiente.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el biocatalizador es producido en el recipiente.
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el biocatalizador comprende microorganismos del género *Rhodococcus*, preferentemente la especie *Rhodococcus rhodochrous*.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el microorganismo es *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164.