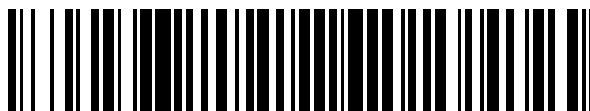


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 489**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 13/02** (2006.01)

**C12R 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013** **E 13199300 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 2749637**

54 Título: **Cepa bacteriana Rhodococcus aetherivorans VKM Ac-2610D que produce nitrilo hidratasa, su método de cultivo y método para producir acrilamida**

30 Prioridad:

**27.12.2012 RU 2012157783**

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

**10.08.2017**

73 Titular/es:

**KEMIRA OYJ (100.0%)  
Porkkalankatu 3  
00180 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**KOZULIN, SERGEY VLADIMIROVICH;  
KOZULINA, TATIANA NICOLAEVNA y  
KOZULIN, ALEXEY SERGEEVICH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 629 489 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 bacteriana *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D que produce nitrilo hidratasa, su método de cultivo y método para producir acrilamida

### Campo de la invención

5 El presente grupo de invenciones versa sobre biotecnología y la industria microbiológica e incluye:

- una nueva cepa de la bacteria *Rhodococcus aetherivorans* que tiene una elevada actividad de la enzima nitrilo hidratasa;
- un método para su cultivo;
- 10 – un método para producir soluciones concentradas de acrilamida usando células de la cepa como biocatalizador.

### Antecedentes de la invención

15 La capacidad de los microorganismos de transformar los carbonitrilos en las correspondientes amidas fue descrita en la bibliografía a comienzos de la década de 1970. La enzima nitrilo hidratasa que cataliza tales reacciones es inherente a una amplia gama de bacterias relacionadas con diversos grupos taxonómicos. Las representantes del género *Rhodococcus* son de interés práctico con respecto al objeto de la presente memoria. Grandes empresas químicas y biotecnológicas de Japón, Corea, Francia, Rusia, Alemania, EE. UU. y China usan, *inter alia*, células de cepas pertenecientes a este género como biocatalizadores eficaces para la producción de acrilamida.

20 Pese a profundas investigaciones del proceso de la hidrólisis enzimática de los nitrilos en las correspondientes amidas y a considerables éxitos en el campo de la sección de cepas productoras de nitrilo hidratasa, la demanda de nuevos biocatalizadores por parte de la industria no ha decaído. Esto es causado, por un lado, por la eficacia y la seguridad ecológica de la producción biotecnológica de amidas, en particular acrilamida, y, por otro, por el elevado coste de cepas y tecnologías patentadas con anterioridad. Por lo tanto, en años recientes se aislaron nuevos microorganismos que eran productores de la enzima nitrilo hidratasa.

25 Sin embargo, las cepas bacterianas conocidas y los métodos de producción de acrilamida que usan tales cepas adolecen de varios inconvenientes. Muchas cepas solo son capaces de producir una concentración máxima de acrilamida inferior al 40% y, por lo tanto, el uso de tales cepas es limitado.

30 Otra desventaja de ciertas cepas es que deben incluirse en su medio de cultivo componentes que son caros y varían en su composición, tales como vitaminas, peptona o extracto de levadura. Algunas cepas únicamente presentan una baja actividad de la nitrilo hidratasa. Para aumentar la actividad, pueden requerirse etapas adicionales, tales como la eliminación de oxígeno del caldo de cultivo, junto con la activación enzimática durante varios días.

Algunas cepas requieren un medio de cultivo que contiene componentes tóxicos. Por ejemplo, puede requerirse acetonitrilo en el medio de cultivo, pero el acetonitrilo es tóxico, volátil, muy inflamable y caro.

35 El documento US5827699 describe la cepa *Rhodococcus rhodochrous* M33, que puede ser cultivada en medios simples que contienen una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, tales como urea sin vitaminas, aminoácidos o extracto de levadura. La descripción de la cepa indica que es capaz de producir acrilamida en una concentración del 46% (p/p).

### Compendio

La cepa bacteriana según la presente invención está caracterizada por lo presentado en la reivindicación 1.

40 El método de producción de acrilamida según la presente invención está caracterizado por lo presentado en la reivindicación 3.

El método de cultivo de la cepa bacteriana según la presente invención está caracterizado por lo presentado en la reivindicación 10.

### Descripción detallada

La presente invención versa sobre una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D.

45 En una realización, la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D es productora de nitrilo hidratasa.

La presente solicitud de patente también versa sobre un método de cultivo de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D.

La presente solicitud también versa sobre un método de producción de acrilamida.

Un objeto del grupo reivindicado de invenciones es la creación de una nueva cepa bacteriana que tiene nitrilo hidratasa de alta actividad para su uso en la producción industrial de productos comercializables.

5 Un objeto del método reivindicado de cultivo de la cepa es el desarrollo de una tecnología para la producción de biomasa de la cepa reivindicada sin un coste superfluo; por otra parte, si es posible, con una reducción de coste con respecto a métodos similares existentes que se usan en la industria.

10 Un objeto del método reivindicado de producción del referido producto mediante el uso de una nueva cepa es el desarrollo de una tecnología de producción de acrilamida en una concentración predeterminada mediante el uso de la nueva cepa sin aumentar el coste del procedimiento y sin complicación adicional de las operaciones del procedimiento.

La presente invención también versa sobre un método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetheivorans* VKM Ac-2610D en el que las células de la cepa son cultivadas usando un medio nutriente que comprende

- 15 un tampón acuoso de fosfato que comprende iones de sodio y potasio;
- una fuente de carbono;
- una fuente de nitrógeno;
- opcionalmente, un inductor enzimático;
- opcionalmente, una sal de cobalto;
- una sal de magnesio;
- 20 una sal de cinc;
- una sal de calcio; y
- una sal de Fe(II).

En una realización, el medio nutriente comprende

- 25 un tampón acuoso de fosfato que comprende iones de sodio y potasio;
- una fuente de carbono;
- una fuente de nitrógeno;
- un inductor enzimático;
- una sal de cobalto;
- una sal de magnesio;
- 30 una sal de cinc;
- una sal de calcio; y
- una sal de Fe(II).

En una realización, el medio nutriente consiste en

- 35 un tampón acuoso de fosfato que comprende iones de sodio y potasio;
- una fuente de carbono;
- una fuente de nitrógeno;
- opcionalmente, un inductor enzimático;
- opcionalmente, una sal de cobalto;
- una sal de magnesio;
- 40 una sal de cinc;

una sal de calcio; y

una sal de Fe(II).

En una realización, el medio nutriente consiste en

un tampón acuoso de fosfato que comprende iones de sodio y potasio;

5 una fuente de carbono;

una fuente de nitrógeno;

un inductor enzimático;

una sal de cobalto;

una sal de magnesio;

10 una sal de cinc;

una sal de calcio; y

una sal de Fe(II).

En una realización, las células de la cepa son cultivadas en el medio nutriente.

En una realización, las células de la cepa están suspendidas en el medio nutriente durante el cultivo.

15 En una realización, el pH del medio nutriente es 6,3-8,3. En una realización, el pH del medio nutriente es 7,0-7,4.

En una realización, el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de 26-31°C. En una realización, el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de 28-30°C. En este contexto, debería entenderse que la expresión "el procedimiento" se refiere al procedimiento de cultivo de las células de la cepa usando el medio nutriente.

En una realización, las células de la cepa bacteriana son cultivadas con agitación.

20 En una realización, las células de la cepa bacteriana son cultivadas con aireación.

En una realización, las células de la cepa bacteriana son cultivadas hasta que el desarrollo de las células de la cepa bacteriana entra en la fase estacionaria.

En una realización, las células de la cepa bacteriana son cultivadas hasta que se logre una producción predeterminada de células de la cepa bacteriana.

25 La producción predeterminada puede variar dependiendo, por ejemplo, de la cantidad de biomasa que debería ser obtenida para el procedimiento de producción de acrilamida, o de la actividad de la nitrilo hidratasa de las células de la cepa bacteriana.

30 El logro de una producción predeterminada de células puede determinarse mediante métodos conocidos tales como la medición de la densidad óptica del cultivo o la medición del peso seco de la masa de células. La densidad óptica, o absorbancia, puede medirse, por ejemplo, en un calorímetro fotoeléctrico, según se describe posteriormente. Asimismo, dichos métodos pueden ser usados para determinar cuándo el desarrollo de las células de la cepa bacteriana entra en la fase estacionaria.

35 En una realización, las células de la cepa bacteriana son cultivadas hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40. En este contexto, se debería entender que la "suspensión" se refiere al medio nutriente que comprende las células de la cepa bacteriana suspendida en el mismo.

Una densidad óptica de la suspensión de 36-40 indica que el desarrollo bacteriano ha alcanzado la fase estacionaria. En la presente memoria y en los Ejemplos, la densidad óptica se mide en un calorímetro fotoeléctrico con un grosor de capa óptica de 5 mm a la longitud de onda de 540 nm. Los calorímetros fotoeléctricos o espectrofotómetros adecuados para medir la densidad óptica son muy conocidos en la técnica.

40 En una realización, el procedimiento se lleva a cabo hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40.

En una realización, el procedimiento se lleva a cabo hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40 a una longitud de onda de 540 nm y un grosor de la capa óptica de 5 mm.

45 El tampón acuoso de fosfato puede ser cualquier tampón acuoso de fosfato conocido en la técnica, siempre y cuando comprenda iones de sodio (Na<sup>+</sup>) y de potasio (K<sup>+</sup>). Dicho tampón acuoso de fosfato puede ser preparado usando diversas sales fosfato de sodio y de potasio. En una realización, el tampón acuoso de fosfato comprende

una sal fosfato. En una realización, el tampón acuoso de fosfato comprende una sal fosfato seleccionada del grupo constituido por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y cualquier mezcla de los mismos. En una realización, el tampón acuoso de fosfato comprende  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El pH del tampón acuoso de fosfato puede ser seleccionado para ajustar el pH del medio nutriente a 6,3-8,3 o a 7,0-7,4.

- 5 En una realización, la fuente de carbono es seleccionada del grupo constituido por glucosa, celobiosa, fructosa, galactosa, maltosa, manosa, sacarosa, trehalosa, ribosa, glicerol, manitol, sorbitol, salicina, inulina, citrato, piruvato, succinato, fumarato y cualquier mezcla de los mismos.

En una realización, la fuente de carbono es glucosa.

En una realización, el medio nutriente comprende 20,0-60,0 g/l de la fuente de carbono.

- 10 La fuente de nitrógeno puede ser cualquier fuente de nitrógeno que las células de la cepa bacteriana sean capaces de utilizar. Muchas fuentes adecuadas de nitrógeno también son capaces de inducir la actividad de la nitrilo hidratasa. Por lo tanto, una persona experta entenderá que puede incluirse un único compuesto en el medio nutriente tanto como una fuente de nitrógeno y como un inductor enzimático. En una realización, la fuente de nitrógeno es seleccionada del grupo constituido por carbamida, leucina, acetamida o cualquier mezcla de las mismas. En una realización, la fuente de nitrógeno es carbamida.

- 15 En este contexto, las palabras "inductor enzimático" e "inductor" pueden ser usadas de forma intercambiable y se refieren a un agente capaz de inducir la actividad de la nitrilo hidratasa. En la técnica se conocen varios inductores enzimáticos capaces de inducir la actividad de la nitrilo hidratasa. En una realización, el inductor enzimático es carbamida. En una realización, el inductor enzimático es una amida alifática. En una realización, el inductor enzimático es seleccionado del grupo constituido por propionamida, isobutiramida, acetamida y una mezcla de las mismas.

- 20 En una realización, la fuente de nitrógeno e inductor es carbamida. Puede utilizarse carbamida (urea) como fuente de nitrógeno respetuosa con los microorganismos y que está inmediatamente disponible para fines industriales. También puede funcionar como inductor enzimático.

- 25 En una realización, el medio nutriente comprende 10,0-24,0 g/l de la fuente de nitrógeno.

La sal de cobalto puede ser cualquier sal soluble de cobalto. Los iones de cobalto se utilizan como cofactores para la enzima nitrilo hidratasa. En una realización, la sal de cobalto es  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CoSO}_4$  o una mezcla de los mismos. En una realización, la sal de cobalto es  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o una mezcla de los mismos. En una realización, el medio nutriente comprende 0,04-0,085 g/l de la sal de cobalto.

- 30 La sal de magnesio puede ser cualquier sal soluble de magnesio. Los iones de magnesio proporcionados por la sal de magnesio son utilizados en las funciones de transporte de las células de la cepa bacteriana. En una realización, la sal de magnesio es  $\text{MgSO}_4$ . En una realización, la sal de magnesio es  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . En una realización, el medio nutriente comprende 10,0-24,0 g/l de la sal de magnesio.

- 35 La sal de cinc puede ser cualquier sal soluble de cinc. Los iones de cinc proporcionados por la sal de cinc pueden ser utilizados en la descomposición de la fuente de nitrógeno, tal como carbamida. En una realización, la sal de cinc es  $\text{ZnSO}_4$ . En una realización, la sal de cinc es  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . En una realización, el medio nutriente comprende 0,08-0,4 g/l de la sal de cinc.

- 40 La sal de calcio puede ser cualquier sal soluble de calcio. Los iones de calcio proporcionados por la sal de calcio pueden estar implicados en la utilización de la fuente de carbono, tal como glucosa. En una realización, la sal de calcio es seleccionada del grupo constituido por  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_4\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y cualquier mezcla de los mismos. En una realización, el medio nutriente comprende 0,2-0,6 g/l de la sal de calcio.

- 45 La sal de Fe(II) puede ser cualquier sal soluble de Fe(II). Los iones ferrosos proporcionados por la sal son utilizados en la respiración. En una realización, la sal de Fe(II) está en forma de complejo de quelato. En una realización, la sal de Fe(II) es  $\text{FeSO}_4$  en forma de complejo de quelato. En una realización, la sal de Fe(II) es  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en forma de complejo de quelato. En una realización, el medio nutriente comprende 0,025-0,05 g/l de la sal de Fe(II).

- 50 En una realización, la sal de magnesio es  $\text{MgSO}_4$ ; la sal de cinc es  $\text{ZnSO}_4$ ; la sal de calcio es seleccionada del grupo constituido por  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_4\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y cualquier mezcla de los mismos; y la sal de Fe(II) es  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en forma de complejo de quelato.

La fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el inductor, y la sal de cobalto pueden ser introducidos en el medio nutriente en una porción o en varias porciones durante el cultivo y el desarrollo celular.

El medio nutriente es de fabricación simple y barata. También permite una producción elevada de biomasa de la cepa bacteriana y una actividad elevada de la nitrilo hidratasa en la biomasa de la cepa bacteriana.

En una realización, el medio nutriente no comprende vitaminas, aminoácidos, peptonas, extractos de plantas, extractos de levadura y/o acetonitrilo.

La biomasa producida puede ser separada posteriormente. Los métodos para separar la biomasa producida son muy conocidos en la técnica.

- 5 En una realización, las células de la cepa son sembradas en un medio nutriente sólido y cultivadas durante un periodo de tiempo; después se lava la biomasa, y la suspensión resultante es usada para la inoculación de un primer recipiente que comprende el medio nutriente, y el procedimiento se lleva a cabo durante un periodo de tiempo con agitación para lograr una densidad óptica de la suspensión en el intervalo de 2-16 unidades a una longitud de onda de 540 nm y un grosor de la capa óptica de 5 mm; a continuación, la suspensión resultante es usada para la inoculación de un segundo recipiente que tiene un volumen que es 10-100 veces mayor que el volumen del primer recipiente, comprendiendo el segundo recipiente un nuevo medio nutriente, para lograr una densidad óptica de 0,1-0,3 en el segundo recipiente; el procedimiento continúa durante un periodo de tiempo con aireación hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40 y un pH de 7,5-7,8; a continuación, se separa la biomasa producida.

- 15 En una realización, las células de la cepa son sembradas en un medio nutriente sólido y cultivadas durante 24-48 horas, después se lava la biomasa, y la suspensión resultante es usada para la inoculación de un primer recipiente que comprende el medio nutriente, y el procedimiento se lleva a cabo durante 24-48 horas con agitación para lograr una densidad óptica de la suspensión en el intervalo de 2-16 unidades a una longitud de onda de 540 nm y un grosor de la capa óptica de 5 mm; a continuación, la suspensión resultante es usada para la inoculación de un segundo recipiente que tiene un volumen que es 10-100 veces mayor que el volumen del primer recipiente, comprendiendo el segundo recipiente un nuevo medio nutriente, para lograr una densidad óptica de 0,1-0,3 en el segundo recipiente; el procedimiento continúa durante 48-120 horas con aireación hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40 y un pH de 7,5-7,8; a continuación, se separa la biomasa producida.

- 25 Las células de la cepa bacteriana pueden ser cultivadas como un cultivo en una única etapa en el que las células de la cepa bacteriana son cultivadas en el medio nutriente hasta que se logra una primera producción predeterminada de células. Las células de la cepa bacteriana también pueden ser cultivadas como un cultivo en dos etapas, en el que las células de la cepa bacteriana son cultivadas en el medio nutriente en un primer recipiente y, posteriormente, el cultivo o suspensión resultante es usado para inocular un nuevo medio nutriente en un segundo recipiente; las células de la cepa bacteriana son cultivadas en el nuevo medio nutriente hasta que se logra una segunda producción predeterminada de células. No es preciso que las producciones predeterminadas primera y segunda sean iguales. Normalmente, no es preciso que la primera producción predeterminada sea tan elevada como la segunda producción predeterminada.

El cultivo en dos etapas en el que las células de la cepa son cultivadas en el primer recipiente en una primera etapa y en el segundo recipiente como segunda etapa puede permitir una mejor adaptación de la cepa bacteriana al medio y una mejor síntesis enzimática.

- 35 El medio nutriente sólido puede ser, por ejemplo, un agar con carne y peptona, agar de medio de LB, un medio sintético o cualquier otro medio nutriente sólido que sea capaz de soportar el desarrollo de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D.

La biomasa puede lavarse, por ejemplo, con una solución fisiológica estéril, tal como suero fisiológico con tampón de fosfato. La solución fisiológica estéril puede tener un pH de 7,0 - 7,4.

- 40 La agitación del primer recipiente puede ser, por ejemplo, una agitación circular a una velocidad de 140-160 rpm.

En este contexto, debería entenderse que la expresión "nuevo medio nutriente" se refiere a un nuevo volumen del medio nutriente definido anteriormente.

- 45 La invención también versa sobre un método de cultivo de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en el que las células de la cepa son sembradas en rampa de agar con carne y peptona y cultivadas durante 24-48 horas, después se lava la biomasa con una solución fisiológica estéril que tiene un pH de 7,0-7,4, y la suspensión resultante es usada para la inoculación de un primer recipiente que comprende un medio nutriente de la siguiente composición, g/l:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3
glucosa	10,0-20,0
carbamida	2,0-6,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0

## ES 2 629 489 T3

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,08-0,2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01-0,02
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O en forma de complejo de quelato	0,01-0,025
agua destilada	hasta 1 l
pH	7,0-7,4;

y el procedimiento se lleva a cabo durante 24-48 horas a una temperatura de 28-30°C con agitación circular a una velocidad de 140-160 rpm para lograr una densidad óptica de la suspensión en el intervalo de 2-16 unidades a una longitud de onda de 540 nm con un grosor de la capa óptica de 5 mm. Después, la suspensión resultante es usada para la inoculación de un segundo recipiente que tiene un volumen que es 10-100 veces mayor que el volumen del primer recipiente, comprendiendo el segundo recipiente un nuevo medio nutriente de la siguiente composición, g/l:

5

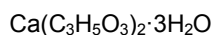
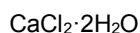
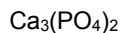
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,65
glucosa	20,0-60,0
carbamida	10,0-24,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,8-1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,08-0,4
una sal de calcio	0,2-0,6
una sal de cobalto	0,04-0,085
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O en forma de complejo de quelato	0,025-0,05
agua destilada	hasta 1 l
pH	7,0-7,4;

para lograr una densidad óptica de 0,1-0,3 en el segundo recipiente; el procedimiento continúa durante 48-120 horas a una temperatura de 26-31°C, una aireación de 0,5-1,0 de volumen de aire/volumen de medio por minuto hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40 y un pH de 7,5-7,8; a continuación, se separa la biomasa obtenida.

10 En una realización del método de cultivo anteriormente descrito de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D, el medio nutriente en el segundo recipiente puede comprender una de las siguientes sales como una sal de calcio:



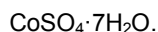
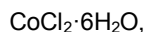
15



20



y una de las siguientes sales como una sal de cobalto:



La presente invención también versa sobre un método de producción de acrilamida mediante hidratación de acrilonitrilo usando una biomasa de una cepa perteneciente al género *Rhodococcus* y que tiene actividad de la nitrilo hidratasa, en el que la hidratación se lleva a cabo a una concentración de trabajo de acrilonitrilo que no es mayor del 0,5%, usando una biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D.

5 Mediante el método se obtiene un producto final que contiene acrilamida.

En una realización, la hidratación va seguida por el aislamiento del producto final de acrilamida.

Debería entenderse que la expresión "producto final de acrilamida" se refiere a la acrilamida contenida en el producto final. Los métodos que son adecuados para aislar la acrilamida del producto final son conocidos en la técnica.

10 El acrilonitrilo es un compuesto tóxico, y debería mantenerse una concentración adecuada de trabajo del mismo que no sea tóxica para la cepa bacteriana. La cepa bacteriana tolera una concentración de trabajo de acrilonitrilo que no sea mayor del 0,5%. Dicha concentración de trabajo también puede permitir obtener acrilamida en el producto final a una concentración del 45-49%. La concentración de trabajo puede mantenerse cargando acrilonitrilo en la solución de reacción durante la reacción de hidratación. Una persona experta puede seleccionar la concentración de trabajo  
15 de acrilonitrilo, por ejemplo, para que la tasa de hidratación o la cantidad del producto final de acrilamida sea óptima. En una realización, la concentración de trabajo de acrilonitrilo está en el intervalo del 0,01-0,5%, o del 0,05-0,5%, o del 0,1-0,5%.

En una realización, la concentración de trabajo de acrilonitrilo no supera el 0,5%, o está en el intervalo de 0,01-0,5%, o 0,05-0,5%, o 0,1-0,5% en peso con respecto al peso total de la solución de reacción (p/p).

20 En este contexto, debería entenderse que la expresión "concentración de trabajo" se refiere a la concentración en la solución de reacción que comprende la biomasa de la cepa bacteriana y el acrilonitrilo. La solución de reacción también puede comprender otros componentes, tales como agua, acrilamida y/o aditivos cualesquiera.

Debería entenderse que la expresión "solución de reacción" se refiere a la mezcla de reacción que comprende la biomasa de la cepa bacteriana y el acrilonitrilo. La mezcla de reacción también puede comprender otros  
25 componentes, tales como agua, acrilamida y/o aditivos cualesquiera.

La cantidad de la biomasa de la cepa bacteriana usada puede ser seleccionada, por ejemplo, para que la tasa de hidratación o la cantidad del producto final de acrilamida sea óptima. La cantidad de la biomasa de la cepa bacteriana puede depender, por ejemplo, de la actividad de la nitrilo hidratasa de las células de la cepa bacteriana.

30 En una realización, la biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D se encuentra en aproximadamente 100-1000 g, o 200-1000 g, o 200-800 g, o 300-600 g, o menos de 1000 g, o menos de 500 g, o menos de 400 g en peso seco de la cepa por tonelada del producto final.

En una realización, la biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D se encuentra en aproximadamente 400-500 g en peso seco de la cepa por tonelada del producto final.

35 En este contexto, debería entenderse que la expresión "el producto final" se refiere a la solución de reacción que comprende la biomasa de la cepa y la acrilamida. El producto final también puede comprender otros componentes; por ejemplo, agua, pequeñas cantidades de acrilonitrilo y/o aditivos cualesquiera. Una persona experta entenderá que el acrilonitrilo incluido en la solución de reacción es hidratado por la biomasa de la cepa bacteriana formando la acrilamida. En otras palabras, el producto final se refiere a toda la solución de reacción en la que el acrilonitrilo añadido en la solución de reacción ha sido hidratado formando acrilamida.

40 Debería entenderse que el término "biomasa" se refiere a una masa de células de la cepa bacteriana.

En una realización, el producto final contiene acrilamida en una concentración de al menos el 40%; o al menos el 41%; o al menos el 42%; o al menos el 43%; o al menos el 44%; o el 40-55%; o el 41-55%; o el 42-55%; o el 43-55%; o el 44-55%.

45 En una realización, el producto final contiene acrilamida en una concentración de al menos el 45%; o al menos el 46%; o al menos el 47%; o el 45-55%; o el 45-54%; o el 45-53%; o el 45-52%; o el 45-51%; o el 45-50%; o el 45-49%; o el 46-55%; o el 46-54%; o el 46-53%; o el 46-52%; o el 46-51%; o el 46-50%; o el 46-49%; o el 47-55%; o el 47-54%; o el 47-53%; o el 47-52%; o el 47-51%; o el 47-50%; o el 47-49%.

50 En una realización, el producto final contiene acrilamida en una concentración de al menos el 40%; o al menos el 41%; o al menos el 42%; o al menos el 43%; o al menos el 44%; o el 40-55%; o el 41-55%; o el 42-55%; o el 43-55%; o el 44-55%; o al menos el 45%; o al menos el 46%; o al menos el 47%; o el 45-55%; o el 45-54%; o el 45-53%; o el 45-52%; o el 45-51%; o el 45-50%; o el 45-49%; o el 46-55%; o el 46-54%; o el 46-53%; o el 46-52%; o el 46-51%; o el 46-50%; o el 46-49%; o el 47-55%; o el 47-54%; o el 47-53%; o el 47-52%; o el 47-51%; o el 47-50%; o el 47-49% en peso con respecto al peso total del producto final.



- En un ejemplo correspondiente al Ejemplo 6, para obtener acrilamida en una concentración del 47% en el producto final, se pueden introducir en un reactor 757,2 g de acrilonitrilo, dando como resultado una masa total de reacción de 2157,2 g. Dado que todo el acrilonitrilo es transformado en acrilamida por las células de la cepa bacteriana, se obtiene una concentración final del 47% de acrilamida en el producto final. En este ejemplo, la reacción incluiría 1 g de biomasa (peso seco).
- En una realización, la hidratación de acrilonitrilo se lleva a cabo a una temperatura de 10-23°C.
- En una realización, la hidratación de acrilonitrilo se lleva a cabo a un pH de 6,8-8,4.
- En una realización, la hidratación de acrilonitrilo se lleva a cabo a una temperatura de 10-23°C y a un pH de 6,8-8,4.
- En una realización, una biomasa de la cepa bacteriana está suspendida en una solución acuosa; y
- se añade acrilonitrilo en la solución acuosa para formar una solución de reacción.
- En una realización, se mezcla acrilonitrilo en una suspensión acuosa de una biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D para formar una solución de reacción; y se lleva a cabo una hidratación para que la concentración de trabajo de acrilonitrilo en la solución de reacción se mantenga a no más del 0,5%.
- En una realización, el método comprende las etapas siguientes:
- se suspende una biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en una solución acuosa para obtener una suspensión;
  - se mezcla acrilonitrilo en la suspensión obtenible de la etapa a) para formar una solución de reacción; y
  - se lleva a cabo una hidratación para que la concentración de trabajo de acrilonitrilo en la solución de reacción se mantenga a no más del 0,5%.
- En una realización, la concentración de trabajo de acrilonitrilo en la solución de reacción se mantiene a no más del 0,5% hasta que se obtiene un producto final que contiene acrilamida en una concentración de al menos el 45%.
- En una realización del método que incluye la hidratación de acrilonitrilo usando una biomasa de una cepa perteneciente al género *Rhodococcus*, que tiene actividad de la nitrilo hidratasa, y luego el aislamiento del producto final, es decir, la acrilamida, la hidratación se lleva a cabo a una concentración de trabajo de acrilonitrilo de no más del 0,5%, usando una biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en una cantidad de aproximadamente 400-500 g en peso seco de la cepa por tonelada del producto final, que es acrilamida en una concentración de 45-49%.
- En la presente memoria también se da a conocer el producto final obtenible por una o más realizaciones del método de producción de acrilamida.
- El producto final comprende una biomasa de la cepa bacteriana y acrilamida. El producto final puede comprender, además, otros componentes; por ejemplo, agua, pequeñas cantidades de acrilonitrilo y/o aditivos cualesquiera.
- El producto final contiene acrilamida en una concentración de al menos el 40%; o al menos el 41%; o al menos el 42%; o al menos el 43%; o al menos el 44%; o el 40-55%; o el 41-55%; o el 42-55%; o el 43-55%; o el 44-55%.
- El producto final contiene acrilamida en una concentración de al menos el 45%; o al menos el 46%; o al menos el 47%; o el 45-55%; o el 45-54%; o el 45-53%; o el 45-52%; o el 45-51%; o el 45-50%; o el 45-49%; o el 46-55%; o el 46-54%; o el 46-53%; o el 46-52%; o el 46-51%; o el 46-50%; o el 46-49%; o el 47-55%; o el 47-54%; o el 47-53%; o el 47-52%; o el 47-51%; o el 47-50%; o el 47-49%.
- El producto final contiene acrilamida en una concentración de al menos el 40%; o al menos el 41%; o al menos el 42%; o al menos el 43%; o al menos el 44%; o el 40-55%; o el 41-55%; o el 42-55%; o el 43-55%; o el 44-55%; o al menos el 45%; o al menos el 46%; o al menos el 47%; o el 45-55%; o el 45-54%; o el 45-53%; o el 45-52%; o el 45-51%; o el 45-50%; o el 45-49%; o el 46-55%; o el 46-54%; o el 46-53%; o el 46-52%; o el 46-51%; o el 46-50%; o el 46-49%; o el 47-55%; o el 47-54%; o el 47-53%; o el 47-52%; o el 47-51%; o el 47-50%; o el 47-49% en peso con respecto al peso total del producto final.

#### Resultado técnico proporcionado por el grupo reivindicado de invenciones

- La cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D está caracterizada por desarrollarse en un medio orgánico-mineral simple y tener elevada actividad de la nitrilo hidratasa de hasta 332 U/mg a 20°C o 521 U/mg a 25°C. La nitrilo hidratasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D es termoestable.
- La cepa fue aislada de aguas residuales de la fabricación de acrilamida y poli-acrilamida y no fue modificada genéticamente. Es especialmente importante para su uso como biocatalizador industrial, porque la legislación de muchos países limita el uso de microorganismos modificados genéticamente.

5 El método desarrollado de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D hace posible que haya una gran producción de células que tienen actividad elevada sobre un medio nutriente orgánico-mineral simple, que no comprende inductores, vitaminas, aminoácidos ni extractos de plantas caros. Dado que todos los componentes del medio nutriente están disponibles comercialmente, el coste del biocatalizador industrial preparado con base en la cepa reivindicada es reducido. El método de cultivo según una o más realizaciones es óptimo para el rápido desarrollo de la cepa bacteriana. Además, el método de cultivo según una o más realizaciones puede ser usado para proporcionar una biomasa de la cepa bacteriana que puede ser usada en el método de producción de acrilamida según una o más realizaciones.

10 El método de producción de acrilamida mediante su síntesis usando la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D descrita en esta solicitud es económicamente ventajoso. Las condiciones de síntesis de soluciones concentradas de acrilamida están optimizadas. La cepa reivindicada es aislada de las aguas residuales de la fabricación de acrilamida y poliácridamida mediante un método de siembra directa en un medio selectivo.

15 La cepa bacteriana reivindicada de *Rhodococcus aetherivorans* fue depositada según el Tratado de Budapest por el empresario particular Sergey Kozulin en la colección íntegramente rusa de microorganismos (Colección Rusa de Microorganismos (VKM), Instituto G. K. Skryabin de Bioquímica y Fisiología de Microorganismos, Academia Rusa de Ciencias, Prospekt Nauki N° 5, Pushchino 142290 (Zona de Moscú), Federación Rusa) con número de acceso VKM Ac-2610D (referencia identificativa dada por el depositante: *Rhodococcus aetherivorans* KTN26-1). La Autoridad Depositaria recibió la cepa el 20.07.2012, y el depósito fue convertido en un depósito según el Tratado de Budapest el 15.11.2013. La cepa está caracterizada por las siguientes propiedades morfológicas, de cultivo y bioquímicas.

20 *Propiedades morfológicas:* cepa grampositiva que tiene un ciclo vital de *Rhodococcus*, no mótil, no formadora de esporas, no forma quistes, es intolerante a los ácidos, aeróbica.

25 *Propiedades del cultivo:* forma colonias lisas redondas en el agar con carne y peptona, que tienen un color entre amarillo-anaranjado y rojo-anaranjado y un diámetro de 1-2 mm (después de 72-96 horas). Cuando crece en medios especiales, se disocia en formas R, S y M.

30 *Propiedades fisiológicas:* La cepa es negativa a la oxidasa, positiva a la catalasa y la fosfatasa, reduce nitratos a nitritos. Hidroliza el almidón, el Tween 60 y el Tween 80; no hidroliza la celulosa, la esculina ni el ADN. Se desarrolla a un pH de 5,5-9,5, siendo el valor óptimo del pH 7,2±0,2; a una temperatura de 5-45°C, siendo el valor óptimo 29±1°C. Como fuente única de carbono usa: celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, manosa, sacarosa, trehalosa, ribosa, glicerol, manitol, sorbitol, pero no usa dulcitol ni inositol. La cepa se desarrolla sobre salicina, inulina, citrato, piruvato, succinato, fumarato, pero no se desarrolla sobre gluconato. Utiliza ácidos *meta* y *para*-hidroxibenzoicos, isobutanol, 2,3-butilenglicol, monoetanol amina. Usa leucina y acetamida como fuente única de nitrógeno.

*Patogenicidad:* la cepa no es patógena.

35 Con base en las anteriores propiedades, según el Manual de bacteriología determinativa de Bergey (Opređeli tel bakteriy Berdgy, Moscú: Mir, 1997) y el análisis de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción de un gen 16S del ácido ribonucleico ribosómico, la cepa es atribuida al género *Rhodococcus*, especie *aetherivorans*.

El método de cultivo de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D puede ser llevado a cabo como sigue.

40 Las células de la cepa *Rhodococcus aetherivorans* almacenadas a temperatura de 4°C en bandas de medio de LB agarizado al 0,4% o caldo de carne y peptona pueden ser sembradas en una rampa de agar con carne y peptona y cultivadas durante 24-48 horas. La biomasa obtenida puede ser lavada con una solución fisiológica estéril que tiene un pH de 7,0-7,4. La suspensión obtenida puede ser usada para la inoculación de un primer recipiente que comprende un medio nutriente de la siguiente composición, g/l:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3
glucosa	10,0-20,0
carbamida	2,0-6,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,08-0,2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2

## ES 2 629 489 T3

CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01-0,02
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O en forma de complejo de quelato	0,01-0,025
agua destilada	hasta 1 l
pH	7,0-7,4;

El procedimiento puede llevarse a cabo durante 24-48 horas a una temperatura de 28-30°C con agitación circular a una velocidad de 140-160 rpm para lograr una densidad óptica de la suspensión en el intervalo de 2-16 unidades medidas en un calorímetro fotoeléctrico con un grosor de la capa óptica de 5 mm a la longitud de onda de 540 nm.

- 5 A continuación, la suspensión resultante puede ser usada para inocular un segundo recipiente (mayor) que tiene un volumen que es 10-100 veces mayor que el volumen del primer recipiente; por ejemplo, un gran matraz o fermentador que comprende un nuevo medio nutriente de la siguiente composición, g/l:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,65
glucosa	20,0-60,0
carbamida	10,0-24,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,8-1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,08-0,4
una sal de calcio	0,2-0,6
una sal de cobalto	0,04-0,085
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O en forma de complejo de quelato	0,025-0,05
agua destilada	hasta 1 l
pH	7,0-7,4.

El medio nutriente en el segundo recipiente puede comprender una de las sales siguientes como una sal de calcio: CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, CaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, Ca(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, Ca(HOCH<sub>2</sub>(CHOH)<sub>4</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; y una de las sales siguientes como una sal de cobalto: CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

- 10 Pueden introducirse glucosa, carbamida y sales de cobalto en el medio nutriente en una porción o en varias porciones durante el desarrollo de las células.

- 15 El valor de la densidad óptica en el segundo recipiente puede ser llevado hasta las 0,1-0,3 unidades. El procedimiento puede continuar durante 48-120 horas a una temperatura de 26-31°C, una aireación de 0,5-1,0 de volumen de aire/volumen de medio por minuto hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión en el intervalo de 36-40 y un pH de 7,5-7,8. Tras el fin del procedimiento, se separa la biomasa por medio de cualquier método conocido, tal como centrifugación, floculación, flotación, sedimentación con un filtrado posterior. La implementación de este método de cultivo de la cepa *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D puede dar una producción celular de 10-18 g/l con una actividad de la enzima nitrilo hidratasa de 250-332 U/mg. La biomasa puede ser usada después en procedimientos de producción de acrilamida.

- 20 La comprobación de la actividad de la enzima nitrilo hidratasa puede llevarse a cabo como sigue: se prepara una suspensión de células en tampón de fosfato 0,01 M, pH 7,6, a una concentración de 0,04-0,06 mg de células (en peso seco) /ml. Se introduce un sustrato de acrilonitrilo en la cantidad de 25 µl en 1 ml de suspensión. Se lleva a cabo una reacción de transformación en un baño de agua a una temperatura de 20-25°C y con agitación durante 10 min. Se detiene la reacción añadiendo 50 µl de 6N HCl. Las células bacterianas son separadas por centrifugación.
- 25 La concentración de acrilamida en el sobrenadante es determinada mediante un método espectrofotométrico o de cromatografía de gases. Las medidas de la actividad de la nitrilo hidratasa descritas en la presente memoria y en los Ejemplos se llevaron a cabo a una temperatura de 20°C, a no ser que se indique algo distinto.

- 30 Una unidad de la actividad específica de la nitrilo hidratasa (U/mg) es la cantidad de la enzima que cataliza la generación de 1 µM de acrilamida por unidad de tiempo (1 minuto) en 1 mg de células (en peso seco). Una unidad de la actividad total de la nitrilo hidratasa (U/ml) es la cantidad de unidades enzimáticas contenidas en 1 ml del caldo de cultivo.

En detalle, el método de producción de acrilamida puede llevarse a cabo como sigue.

Las células de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D obtenida según se ha indicado en la descripción del método de cultivo, pueden ser separadas del caldo de cultivo según cualquier método conocido, lavadas con agua desalada, pH 7,0-7,6. La cantidad de agua que puede usarse para el lavado puede ser 1-10 volúmenes/volumen de células. Las células lavadas pueden ser suspendidas en agua de grifo o destilada, pH 6,8-8,4, a aproximadamente 400-500 g de células (en peso seco) por tonelada del producto final; es decir, puede prepararse una solución de acrilamida al 45-49%, dependiendo de la concentración deseada del producto final y del tiempo de síntesis. La suspensión de células en agua puede ser colocada en un reactor termostático. La reacción de síntesis de la acrilamida puede llevarse a cabo en el intervalo de pH de 6,8-8,4. Puede cargarse acrilonitrilo en la solución de reacción durante la transformación para que su concentración en la solución no supere el 0,5%. La mezcla de reacción puede ser agitada constantemente. La temperatura de la solución de reacción puede ser mantenida en el intervalo de 10-23°C. El tiempo de reacción puede ser 5-8 horas. La acrilamida y el acrilonitrilo en la solución de reacción pueden ser analizados mediante cualquier método conocido; por ejemplo, cromatografía de líquidos o gases, espectrofotometría, refractometría. El análisis puede llevarse a cabo al menos una vez por hora. El procedimiento puede detenerse después de una caída repentina en la velocidad de hidrólisis del acrilonitrilo. Tras la terminación del procedimiento, las células del biocatalizador pueden ser separadas de la mezcla de reacción mediante cualquier método conocido; por ejemplo, mediante floculación, filtrado, flotación, centrifugación. El procedimiento puede dar soluciones que tienen una concentración de acrilamida de, por ejemplo, 45-49%.

Una persona experta entenderá que los métodos pueden ser cambiados de escala para cultivar grandes biomásas de la cepa bacteriana y producir grandes cantidades de acrilamida a escala industrial; por ejemplo, utilizando fermentadores y reactores industriales que tienen gran volumen.

### Ejemplos

En lo que sigue, la presente invención será descrita con mayor detalle. La siguiente descripción da a conocer algunas realizaciones y ejemplos de la invención con tal detalle que una persona experta en la técnica pueda utilizar la invención con base en la divulgación. No se exponen con detalle todas las etapas de las realizaciones, ya que muchas de las etapas resultarán obvias para la persona experta en la técnica con base en esta memoria. Los ejemplos siguientes se llevaron a cabo en un laboratorio de pruebas a pequeña escala; sin embargo, una persona experta en la técnica es capaz de cambiar la escala de los ejemplos a voluntad.

Ejemplo 1. Aislamiento de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D, que es productora de la enzima nitrilo hidratasa

La cepa se aísla del agua residual de la fabricación de acrilamida y poli(acrilamida).

Composición del agua residual:

Acrilamida	6,0 g/l;
Acrilonitrilo	3,3 g/l;
Cu <sup>2+</sup>	1,25 mg/l
Zn <sup>2+</sup>	1,93 mg/l
Fe <sup>3+</sup>	0,43 mg/l
Sorbital C-20	trazas.

Para el aislamiento de la cepa, se usó un medio selectivo que representaba un agua residual agarizada que tenía la composición anterior complementada con 0,9 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,5 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g/l de un extracto de levadura. Unas placas con el medio selectivo fueron sembradas con una capa de 0,1 ml de agua residual y cultivadas durante 72-96 horas. Las colonias desarrolladas fueron resembradas dos veces en un agar con carne y peptona para comprobar su pureza y luego fueron analizadas para hallar su capacidad de transformar el acrilonitrilo en acrilamida. Con este fin, las cepas sometidas a ensayo fueron cultivadas en tubos bacteriológicos que tenía un volumen de 40 ml, llenos hasta 1/8 con un medio que tenía la siguiente composición (g/l):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0,9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
Glucosa	20,0
Carbamida	12,0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02

## ES 2 629 489 T3

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
Extracto de levadura	1,0
pH	7,0-7,4

El cultivo se llevó a cabo durante 2 días con agitación, a una temperatura de 28-30°C. La suspensión celular obtenida fue centrifugada durante 1 minuto a 15000 rpm. Las células fueron lavadas con tampón de fosfato 0,01 M, pH 7,6, resuspendidas en 1 ml del mismo tampón y después se midió la actividad de la nitrilo hidratasa según se describe en el ensayo. Esto da como resultado que la cepa tenga una actividad de la nitrilo hidratasa de 95 U/mg.

- 5 Ejemplo 2. Un método de cultivo de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en matraces Erlenmeyer en condiciones de laboratorio.

Las células de la cepa fueron cultivadas en una rampa de agar con carne y peptona durante 36 horas a 28°C. La biomasa obtenida fue lavada con una solución fisiológica estéril, pH 7,0-7,4, y sembrada para un precultivo en un medio nutriente líquido de la siguiente composición, (g/l):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3
Glucosa	12,0
Carbamida	4,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,025
Ácido ascórbico	0,05
Agua destilada	hasta 1 litro
pH	7,0-7,4

- 10 El precultivo se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer a 28-30°C, con agitación circular de 120-160 rpm durante 24-48 horas. Esto da como resultado una suspensión celular que tiene una densidad óptica de 4,6 unidades a λ 540 nm, l=5 mm. La suspensión obtenida en la cantidad de 2 ml fue sembrada asepticamente en un medio de cultivo que tenía la siguiente composición, g/l:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,65
Glucosa	40,0
Carbamida	24,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,24
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,06
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
Ácido ascórbico	0,10
Agua destilada	hasta 1 litro
pH	7,0-7,4

- 5 El cultivo se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer que tenían un volumen de 300 ml, llenos hasta 1/6 con el medio, durante 4 días con agitación circular (160 rpm), a una temperatura de 28-30°C. Después de la finalización del cultivo, se determinó la concentración de células y la actividad de la nitrilo hidratasa en muestras. La producción de células después de 96 horas de cultivo fue de 16,0 g/l, la actividad específica de la nitrilo hidratasa fue 332 U/mg a 20°C y 521 U/mg a 25°C, la actividad total de la nitrilo hidratasa fue 5312 U/ml a 20°C y 8336 U/ml a 25°C. La determinación de la actividad a 25°C se llevó a cabo para tener una comparación con una cepa de *Rhodococcus ruber* GT.

Para confirmar la escalabilidad del método de cultivo y a posibilidad del uso industrial de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D, se llevó a cabo un cultivo de esta cepa en un fermentador que tenía un volumen de 3 litros.

- 10 Ejemplo 3. Cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en un fermentador.

Se preparó durante 28 horas un inóculo que representaba una suspensión de células en un medio de cultivo. Con este fin se cultivaron células con agitación circular (160 rpm), a una temperatura de 28-30°C en matraces Erlenmeyer que tenían un volumen de 300 ml llenos hasta 1/6 con el medio, que tenía la siguiente composición, (g/l):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3
Glucosa	12,0
Carbamida	4,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,025
EDTA	0,05
Agua destilada	hasta 1 litro
pH	7,0-7,4

- 15 Esto dio como resultado una suspensión celular que tenía una densidad óptica de 6 unidades a λ 540 nm, l=5 mm. Se usaron 100 ml de la suspensión celular obtenida para la inoculación de un fermentador de laboratorio que tenía un volumen de 3 litros (lleno con 1,5 l del medio).

Composición del medio para el fermentador, (g/l):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,65
Glucosa	40,0
Carbamida	22,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,24
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
EDTA	0,10
Agua destilada	hasta 1 litro
pH	7,0-7,4

El cultivo se llevó a cabo a una temperatura de 28°C, una aireación de 0,5-1,0 de volumen de aire/volumen de medio por minuto, con agitación continua de 560 rpm. Periódicamente, una vez cada seis horas, se tomaron muestras del caldo de cultivo de un fermentador para determinar el pH, la producción y la actividad de la nitrilo hidratasa de células. La tabla presenta los datos obtenidos.

Periodo de fermentación, horas	0	6	12	18	24	30	36
pH	7,11	6,95	6,91	6,88	6,87	6,88	6,87
Producción de células, g/l (en peso seco)	0,1	0,4	1,3	2,4	3,7	5,5	7,1
Actividad específica de la nitrilo hidratasa, U/mg	-	40	34	55	126	185	219

5

Periodo de fermentación, horas	42	48	54	60	66	70
pH	6,86	6,85	6,92	6,97	7,06	7,51
Producción de células, g/l (en peso seco)	8,2	9,9	12,6	13,9	16,4	18,1
Actividad específica de la nitrilo hidratasa, U/mg	236	249	256	267	274	280

Después de 70 horas de cultivo, la producción de células fue 18,1 g/l, la actividad específica de la nitrilo hidratasa de células fue 280 U/mg (a 20°C) o 440 U/mg a 25°C, la actividad total de la nitrilo hidratasa fue 5058 U/ml (a 20°C) o 7964 U/ml a 25°C.

10 Ejemplo 4. Preparación de una solución concentrada de acrilamida en un reactor de laboratorio usando las células producidas por el cultivo en matraces.

Se pusieron en agua de grifo 66,2 g de una suspensión celular de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D que tenía una actividad de la nitrilo hidratasa de 270 U/mg en un reactor termostático de 150 dotado de un mezclador magnético y un termómetro; así, el reactor contenía 30 mg (en peso seco) de las células biocatalíticas. Las células se produjeron según se describe en el Ejemplo 2. El pH de la solución de reacción fue 7,6. Se cargaron 24,2 g de acrilonitrilo en el reactor con agitación continua y una temperatura de 17-22°C en todo el periodo de síntesis de modo que la concentración de acrilonitrilo en la solución no superara el 0,3%. La acrilamida y el acrilonitrilo en la solución fueron analizados con un método de cromatografía de gases con una periodicidad de una vez por hora. Después de 7,0 horas de síntesis, la reacción se detuvo porque disminuyó la velocidad de hidrólisis del acrilonitrilo. Las células fueron separadas de la solución de reacción mediante centrifugación. La concentración de acrilamida en la solución fue del 49%; no había presencia de acrilonitrilo residual.

Para confirmar la posibilidad de uso de la cepa de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en un procedimiento de la preparación industrial de acrilamida y de la escalabilidad de la tecnología reivindicada, se llevó a cabo una síntesis de acrilamida en un aparato que tenía un volumen de 3 litros que es análogo del reactor industrial.

25 Ejemplo 5. Síntesis de una solución concentrada de acrilamida en un reactor de 3 l que usa las células obtenidas por el cultivo en matraces.

En un reactor de 3 litros dotado de un mezclador mecánico y camisa para la eliminación de calor, y controlado termostáticamente en un intervalo de temperaturas de 20-22°C, se cargó una suspensión celular de 1,4 l de la cepa de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en el agua desalada que tenía una actividad de la enzima nitrilo hidratasa de 254 U/mg; así, el reactor comprendía 1 g (en peso seco) de las células biocatalíticas. Las células fueron obtenidas según se ha descrito en el Ejemplo 2. El pH de la solución de reacción fue 7,4. El acrilonitrilo fue introducido en la solución de reacción mientras ocurría su transformación de modo que la concentración de acrilonitrilo, tanto inicial como actual, no superara el 0,5%. Después de 5 horas de la reacción, se obtuvo una solución de acrilamida que tenía una concentración del 47%. Después, la reacción se detuvo debido a la abrupta disminución de la velocidad de hidrólisis del acrilonitrilo.

Ejemplo 6. Preparación de una solución concentrada de acrilamida en el reactor que tiene un volumen de 3 litros usando las células producidas mediante cultivo en un fermentador

Se cargaron 1,4 litros de una suspensión celular de la cepa de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en el agua desalada que tiene una actividad de la enzima nitrilo hidratasa de 280 U/mg en un reactor de 3 litros dotado de un mezclador mecánico y camisa para la eliminación de calor, y controlado termostáticamente en el intervalo de temperaturas de 14-23°C; así, el reactor comprendía 1 g (en peso seco) de las células biocatalíticas. Las células fueron obtenidas según se ha descrito en el Ejemplo 3. El pH de la solución de reacción fue 7,8. El acrilonitrilo fue introducido en la solución de reacción mientras ocurría su transformación de modo que la concentración de

40

acrilonitrilo, tanto inicial como actual, no superara el 0,1%. La acrilamida y el acrilonitrilo en la solución fueron analizados con un método de cromatografía de gases con una periodicidad de una vez por hora. Después de 7,0 horas, la reacción se detuvo debido a una disminución de la velocidad de hidrólisis del acrilonitrilo. La concentración de acrilamida en la solución (es decir, el producto final) fue del 49%. No había presencia de acrilonitrilo residual.

- 5 Ejemplo 7. Preparación de una solución concentrada de acrilamida en el reactor que tiene un volumen de 1 litro usando las células producidas mediante cultivo en un fermentador que tiene un volumen de 24 litros

Se desarrolló una biomasa de la cepa bacteriana según se ha descrito en los ejemplos previos, salvo que se usó un fermentador que tenía un volumen de 24 litros. La biomasa fue usada para preparar acrilamida, según se ha descrito en los ejemplos previos usando un reactor que tenía un volumen de 1 litro. La concentración de acrilamida en el producto final obtenido fue del 49,5%.

10 Resulta obvio para una persona experta en la técnica que, con el avance de la tecnología, la idea básica de la invención puede ser implementada de diversas maneras. Así, la invención y sus realizaciones no están limitadas a los ejemplos descritos en lo que antecede, sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.



## REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D.
2. La cepa bacteriana según la reivindicación 1 que es productora de nitrilo hidratasa.
- 5 3. Un método de producción de acrilamida mediante hidratación de acrilonitrilo usando una biomasa de una cepa perteneciente al género *Rhodococcus* y que tiene actividad de la nitrilo hidratasa, en el que la hidratación se lleva a cabo a una concentración de trabajo de acrilonitrilo que no es mayor del 0,5%, usando una biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D.
- 10 4. El método de producción de acrilamida según la reivindicación 3 en el que el acrilonitrilo se mezcla en una suspensión acuosa de una biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D para formar una solución de reacción; y la hidratación se lleva a cabo de modo que la concentración de trabajo de acrilonitrilo en la solución de reacción se mantenga a no más del 0,5%.
- 5 6. El método de producción de acrilamida según la reivindicación 3 o 4 en el que la hidratación es seguida por el aislamiento del producto final de acrilamida.
- 15 6. El método de producción de acrilamida según una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 5 en el que la biomasa de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D se encuentra en aproximadamente 100-1000 g, o 200-1000 g, o 200-800 g, o 300-600 g, o aproximadamente 400-500 g, o menos de 1000 g, o menos de 500 g, o menos de 400 g en peso seco de la cepa por tonelada del producto final.
- 20 7. El método de producción de acrilamida según la reivindicación 6 en el que el producto final contiene acrilamida en una concentración de al menos el 40%; o al menos el 41%; o al menos el 42%; o al menos el 43%; o al menos el 44%; o el 40-55%; o el 41-55%; 42-55%; o el 43-55%; o el 44-55%; o al menos el 45%; o al menos el 46%; o al menos el 47%; o el 45-55%; o el 45-54%; o el 45-53%; o el 45-52%; o el 45-51%; o el 45-50%; o el 45-49%; o el 46-55%; o el 46-54%; o el 46-53%; o el 46-52%; o el 46-51%; o el 46-50%; o el 46-49%; o el 47-55%; o el 47-54%; o el 47-53%; o el 47-52%; o el 47-51%; o el 47-50%; o el 47-49%.
- 25 8. El método de producción de acrilamida según una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 7 en el que la hidratación de acrilonitrilo se lleva a cabo a una temperatura de 10-23°C.
9. El método de producción de acrilamida según una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 8 en el que la hidratación de acrilonitrilo se lleva a cabo a un pH de 6,8-8,4.
- 30 10. Un método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D en el que las células de la cepa son cultivadas usando un medio nutriente que comprende
  - un tampón acuoso de fosfato que comprende iones de sodio y potasio;
  - una fuente de carbono;
  - una fuente de nitrógeno;
  - opcionalmente, un inductor enzimático;
  - opcionalmente, una sal de cobalto;
  - 35 una sal de magnesio;
  - una sal de cinc;
  - una sal de calcio; y
  - una sal de Fe(II).
- 40 11. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según la reivindicación 10 en el que las células de la cepa bacteriana son cultivadas hasta que el desarrollo de las células de la cepa bacteriana entre en la fase estacionaria o hasta que se logra una producción predeterminada de células.
12. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según la reivindicación 10 u 11 en el que el pH del medio nutriente es 6,3-8,3 o 7,0-7,4.
- 45 13. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 12 en el que el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de 26-31°C o a una temperatura de 28-30°C.

14. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 13 en el que las células de la cepa bacteriana son cultivadas hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40.
- 5 15. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 14 en el que el tampón acuoso de fosfato comprende una sal fosfato seleccionada del grupo constituido por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y cualquier mezcla de los mismos.
- 10 16. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 15 en el que la fuente de carbono es seleccionada del grupo constituido por glucosa, celobiosa, fructosa, galactosa, maltosa, manosa, sacarosa, trehalosa, ribosa, glicerol, manitol, sorbitol, salicina, inulina, citrato, piruvato, succinato, fumarato y cualquier mezcla de los mismos.
17. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 16 en el que la fuente de nitrógeno y el inductor son carbamida.
18. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 17 en el que la sal de cobalto es  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CoSO}_4$  o una mezcla de los mismos.
- 15 19. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 18 en el que la sal de magnesio es  $\text{MgSO}_4$ ; y/o la sal de cinc es  $\text{ZnSO}_4$ ; y/o la sal de calcio es seleccionada del grupo constituido por  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_4\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y cualquier mezcla de los mismos; y/o la sal de Fe(II) es  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en forma de complejo de quelato.
- 20 20. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 19 en el que las células de la cepa son sembradas en un medio nutriente sólido y cultivadas durante 24-48 horas, después se lava la biomasa, y la suspensión resultante es usada para la inoculación de un primer recipiente que comprende el medio nutriente, y el procedimiento se lleva a cabo durante 24-48 horas con agitación para lograr una densidad óptica de la suspensión en el intervalo de 2-16 unidades a una longitud de onda de 540 nm y un grosor de la capa óptica de 5 mm; a continuación, la suspensión resultante es usada para la inoculación de un segundo recipiente que tiene un volumen que es 10-100 veces mayor que el volumen del primer recipiente, comprendiendo el segundo recipiente un nuevo medio nutriente, para lograr una densidad óptica de 0,1-0,3 en el segundo recipiente; el procedimiento continúa durante 48-120 horas con aireación hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40 y un pH de 7,5-7,8; a continuación, se separa la biomasa producida.
- 25 30 35 21. El método de cultivo de una cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según una cualquiera de las reivindicaciones 10 - 20 en el que las células de la cepa son sembradas en una rampa de agar con carne y peptona y cultivadas durante 24-48 horas, después se lava la biomasa con una solución fisiológica estéril que tiene un pH de 7,0-7,4, y la suspensión resultante es usada para la inoculación de un primer recipiente que comprende un medio nutriente de la siguiente composición, g/l:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	6,06
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,3
glucosa	10,0-20,0
carbamida	2,0-6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,08-0,2
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01-0,02
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en forma de complejo de quelato	0,01-0,025
agua destilada	hasta 1 l
pH	7,0-7,4;

y el procedimiento se lleva a cabo durante 24-48 horas a una temperatura de 28-30°C con agitación circular a una velocidad de 140-160 rpm para lograr una densidad óptica de la suspensión en el intervalo de 2-16 unidades a una longitud de onda de 540 nm y un grosor de la capa óptica de 5 mm, después la suspensión resultante es usada para

## ES 2 629 489 T3

la inoculación de un segundo recipiente que tiene un volumen que es 10-100 veces mayor que el volumen del primer recipiente, comprendiendo el segundo recipiente un nuevo medio nutriente de la siguiente composición, g/l:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	6,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,65
glucosa	20,0-60,0
carbamida	10,0-24,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,8-1,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,08-0,4
una sal de calcio	0,2-0,6
una sal de cobalto	0,04-0,085
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O en forma de complejo de quelato	0,025-0,05
agua destilada	hasta 1 l
pH	7,0-7,4;

5 para lograr una densidad óptica de 0,1-0,3 en el segundo recipiente; el procedimiento continúa durante 48-120 horas a una temperatura de 26-31°C, una aireación de 0,5-1,0 de volumen de aire/volumen de medio por minuto hasta el logro de una densidad óptica de la suspensión de 36-40 y un pH de 7,5-7,8; a continuación, se separa la biomasa producida.

**22.** El método de cultivo de la cepa bacteriana de *Rhodococcus aetherivorans* VKM Ac-2610D según la reivindicación 21, en el que el medio nutriente en el segundo recipiente comprende una de las sales siguientes como una sal de calcio:

10 CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
 Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O  
 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>  
 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O  
 CaCO<sub>3</sub>

15 CaSO<sub>4</sub>  
 Ca(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O  
 Ca(HOCH<sub>2</sub>(CHOH)<sub>4</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O;

y una de las siguientes sales como una sal de cobalto:

20 CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,  
 CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.