

MÉTODO PARA PREPARAR UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE ACRILAMIDA QUE TIENE UNA BAJA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACRÍLICO

La presente invención se refiere a métodos para preparar soluciones acuosas de acrilamida que tienen una baja concentración de ácido acrílico, a soluciones acuosas de acrilamida que se pueden obtener mediante estos métodos y a homopolímeros o copolímeros de acrilamida que se pueden obtener mediante la polimerización de la acrilamida. Asimismo, la presente invención también se refiere a métodos para reducir la concentración de ácido acrílico de las soluciones acuosas de acrilamida.

La poliacrilamida se usa ampliamente como floculante, como espesante en la industria del papel, como aditivo en la recuperación terciaria de petróleo, y en muchos otros campos. En general, la materia prima para la poliacrilamida es su monómero acrilamida. En principio, existen dos métodos diferentes para producir acrilamida a escala industrial: La síntesis química y la síntesis biológica, en donde los métodos de síntesis biológica aumentan cada vez más debido a condiciones de reacción más leves y seguridad de proceso inherente. Debido a las condiciones de reacción más leves, la ausencia de catalizador de cobre y la conversión cuantitativa del nitrilo, las etapas de procesamiento corriente abajo costosas, tales como destilación o intercambio iónico, se pueden evitar en la síntesis biológica, y esto da como resultado plantas más económicas con una superficie ocupada en planta drásticamente reducida.

Los dos métodos de síntesis usan acrilonitrilo como sustancia de inicio. Mientras que el método de síntesis química usa catalizadores de cobre (por ejemplo, US4048226, US3597481), el método de síntesis biológica (también denominado método de base biológica) utiliza biocatalizadores para hidratar (es decir, para convertir) acrilonitrilo a fin de obtener acrilamida. En general, los biocatalizadores son microorganismos que pueden producir (es decir, que codifican) la enzima nitrilo hidratasa (nomenclatura IUBMB desde el 30 de septiembre de 2014: EC 4.2.1.84; N.º CAS 2391-37-5; también denominada, por ejemplo, NHasa). Los microorganismos que producen nitrilo hidratasa se distribuyen principalmente en el medio ambiente y comprenden, entre otros, representantes de las especies *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus pyridinovorans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus opacus*, *Aspergillus niger*, *Acidovorax avenae*,

Acidovorax facilis, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pallidus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus* sp BR449, *Bradyrhizobium oligotrophicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella variicola*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium opportunistum*, *Mesorhizobium* sp F28, *Moraxella*, *Pantoea endophytica*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* sp CH1, *Brevibacterium* sp CH2, *Brevibacterium* sp R312, *Brevibacterium imperiale*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium hoffmanii*, *Microbacterium imperiale*, *Microbacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia globerula*, *Nocardia rhodochrous*, *Pseudonocardia thermophila*, *Trichoderma*, *Myrothecium verrucaria*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus* sp UFMG- Y28, *Debaryomyces hanseii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum* sp JR1, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula glutinis*, *Comomonas testosteroni*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus* y *Pyrococcus horikoshii*. (véase, por ejemplo, Prasad, *Biotechnology Advances* (2010), 28(6): 725-741; FR2835531). La enzima nitrilo hidratasa es dependiente de hierro o cobalto (es decir, posee un átomo de hierro o cobalto coordinado en su centro de actividad) que se caracteriza particularmente por su capacidad para catalizar la conversión de acrilonitrilo para obtener acrilamida mediante la hidratación de acrilonitrilo (Kobayashi, *Nature Biotechnology* (1998), 16: 733 - 736).

El producto de un método de síntesis biológica para convertir acrilonitrilo en acrilamida es una solución de acrilamida en agua. Sin embargo, la solución acuosa de acrilamida obtenida también contiene, en general, ácido acrílico, que se forma como un subproducto durante la bioconversión.

La acrilamida se usa como un monómero para formar polímeros de acrilamida. Para las reacciones de polimerización, se pueden usar las soluciones acuosas de acrilamida, que se prepararon mediante un método de síntesis biológica.

Sin embargo, se descubrió que el ácido acrílico, que está presente en las soluciones acuosas de acrilamida utilizadas para las reacciones de polimerización, produce una reducción del rendimiento de los polímeros de acrilamida resultantes. Más específicamente, la presencia de ácido acrílico puede afectar significativamente

las propiedades físicas del material de polímero de acrilamida, lo que genera, por ejemplo, solubilidad y rendimiento reducido en diversas aplicaciones, tales como tratamiento de agua, fabricación de papel, recuperación de petróleo o minería.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos biocatalíticos para preparar soluciones acuosas de acrilamida que tienen una baja concentración de ácido acrílico.

La presente invención superó este problema técnico objetivo, como se define en las reivindicaciones y como se describe y se ejemplifica en la presente más adelante.

La presente invención se refiere a un método para preparar una solución acuosa de acrilamida, en donde el método comprende las siguientes etapas:

- (a) agregar los siguientes componentes (i) a (iii) a un reactor para obtener una composición para bioconversión:
 - (i) un biocatalizador capaz de convertir acrilonitrilo en acrilamida;
 - (ii) acrilonitrilo;
 - (iii) agua; y
- (b) realizar una bioconversión en la composición obtenida en la etapa (a);
- (c) agregar más acrilonitrilo y mantener el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) a 0,3 % p/p o más durante 10 minutos a 48 horas, preferentemente, durante 15 minutos a 24 horas, con mayor preferencia, durante 30 minutos a 18 horas y, con máxima preferencia, durante 1 hora a 12 horas, en donde la indicación de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor.

De manera adicional, la presente invención también se refiere a un método para preparar una solución acuosa de acrilamida, en donde el método comprende las siguientes etapas:

- (a) agregar los siguientes componentes (i) a (iii) a un reactor para obtener una composición para bioconversión:
 - (i) un biocatalizador capaz de convertir acrilonitrilo en acrilamida;
 - (ii) acrilonitrilo;
 - (iii) agua; y
- (b) realizar una bioconversión en la composición obtenida en la etapa (a);
- (c) agregar más acrilonitrilo y mantener el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) a 0,3 % p/p o más hasta que se alcanza un contenido de acrilamida de al menos 20 % p/p, preferentemente, de al menos 25 % p/p, con mayor preferencia, de al menos 30 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 35

% p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 40 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 42,5 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 45 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 47,5 % p/p y, con máxima preferencia, de al menos 50 % p/p, en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor.

La presente invención también abarca un método para reducir la concentración de ácido acrílico de una solución acuosa de acrilamida, en donde la solución acuosa de acrilamida se prepara mediante un proceso en donde el acrilonitrilo se convierte en acrilamida usando un biocatalizador, y el método comprende las siguientes etapas:

- (a) agregar los siguientes componentes (i) a (iii) a un reactor para obtener una composición para bioconversión:
 - (i) un biocatalizador capaz de convertir acrilonitrilo en acrilamida;
 - (ii) acrilonitrilo;
 - (iii) agua; y
- (b) realizar una bioconversión en la composición obtenida en la etapa (a);
- (c) agregar más acrilonitrilo y mantener el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) a 0,3 % p/p o más, en donde la indicación de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor.

Teniendo en cuenta estos métodos para preparar una solución acuosa de acrilamida, los inventores descubrieron que al mantener el contenido de acrilonitrilo durante la bioconversión en la etapa (b) a 0,3 % p/p o más durante 10 minutos a 48 horas, o al mantener el contenido de acrilonitrilo durante la bioconversión en la etapa (b) a 0,3 % p/p o más hasta que se alcanza un contenido de acrilamida de al menos 20 % p/p, la concentración de ácido acrílico en la solución acuosa de acrilamida obtenida se reduce. Asimismo, los inventores descubrieron un método para reducir la concentración de ácido acrílico de una solución acuosa de acrilamida, en donde al mantener el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) a 0,3 % p/p o más, la concentración de ácido acrílico en la solución acuosa de acrilamida se reduce. Con referencia a cualquiera de los métodos descritos en la presente para preparar una solución acuosa de acrilamida o para reducir la concentración de ácido acrílico de una solución acuosa de acrilamida, la reducción de la concentración de ácido acrílico en la solución acuosa de acrilamida significa que una solución acuosa de acrilamida preparada de acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención, en

donde el contenido de acrilonitrilo durante la bioconversión en la etapa (b) se mantiene a 0,3 % p/p o más, tiene una concentración menor de ácido acrílico en comparación con una solución acuosa de acrilamida, que se prepara usando un método, en donde el contenido de acrilonitrilo durante la bioconversión no se mantiene a 0,3 % p/p o más.

El término “bioconversión” como se usa en la presente en el contexto de cualquiera de los métodos de la presente invención indica, en general, una reacción, en donde el acrilonitrilo se convierte en acrilamida en presencia de agua y un biocatalizador. La acrilamida se disuelve en el agua, de manera que se forma una solución acuosa de acrilamida mediante cualquiera de los métodos descritos y proporcionados en la presente. Como se usa en la presente, el término “composición” incluye todos los componentes presentes en el reactor, tales como el biocatalizador, acrilonitrilo, acrilamida y agua.

Como se usa con respecto a cualquiera de los métodos descritos en la presente, el término “biocatalizador” comprende, en particular, microorganismos (por ejemplo, bacterias o eucariotas protozoos) y enzimas que son capaces de convertir acrilonitrilo en acrilamida. Los métodos para determinar la capacidad de un determinado biocatalizador (por ejemplo, microorganismo o enzima) para convertir acrilonitrilo en acrilamida se conocen en el estado de la técnica. A modo de ejemplo, en el contexto de cualquiera de los métodos de la presente invención, la actividad de un determinado biocatalizador de ser capaz de convertir acrilonitrilo en acrilamida en el sentido de la presente invención se puede determinar de la siguiente manera: En primer lugar, haciendo reaccionar 100 μ l de una suspensión celular, un lisado celular, un polvo de enzima disuelto o cualquier otra preparación que contenga el supuesto biocatalizador con 875 μ l de 50 mM de un amortiguador de fosfato de potasio y 25 μ l de acrilonitrilo a 25 °C en un agitador de tubos Eppendorf a 1000 rpm durante 10 minutos. Después de 10 minutos de tiempo de reacción, las muestras se pueden retirar e inactivar inmediatamente agregando el mismo volumen de 1,4 % de ácido clorhídrico. Después de mezclar la muestra, las células se pueden retirar mediante centrifugación durante 1 minuto a 10.000 rpm, y la cantidad de acrilamida formada se determina analizando el sobrenadante transparente mediante HPLC. Para afirmar que un biocatalizador es capaz de convertir acrilonitrilo en acrilamida en el contexto de la presente invención, la concentración de acrilamida debe ser entre 0,25 y 1,25 mmol/l - de ser necesario, la muestra se debe diluir en consecuencia, y la conversión se debe repetir. La actividad luego se puede deducir de la concentración de acrilamida

dividiendo la concentración de acrilamida derivada del análisis de HPLC por el tiempo de reacción, que fue de 10 minutos, y multiplicando este valor por el factor de dilución entre la muestra de HPLC y la muestra original. Las actividades >5 U/mg de peso celular seco, preferentemente, >25 U/mg de peso celular seco, con mayor preferencia, >50 U/mg de peso celular seco, con máxima preferencia, >100 U/mg de peso celular seco indican la presencia de un biocatalizador funcional, y se considera que el biocatalizador es capaz de convertir acrilonitrilo en acrilamida en el contexto de la presente invención.

Más específicamente, mediante la utilización de cualquiera de los métodos de la presente invención, la concentración de ácido acrílico de la composición al final de la bioconversión puede ser 1500 ppm o menos, preferentemente, 1200 ppm o menos, con mayor preferencia, 1000 ppm o menos, con mayor preferencia, 750 ppm o menos, aun con mayor preferencia, 500 ppm o menos, aun con mayor preferencia, 300 ppm o menos, aun con mayor preferencia, 200 ppm o menos y, con máxima preferencia, 100 ppm o menos, en donde cada una de las indicaciones de ppm se refiere a partes en peso y al peso total de la composición al final de la bioconversión. Al respecto, la expresión “final de la bioconversión” indica, en cualquiera de los métodos descritos en la presente, que se alcanzó una conversión sustancialmente total de acrilonitrilo en acrilamida. La expresión “conversión sustancialmente total de acrilonitrilo en acrilamida” significa, en particular, que el contenido de acrilonitrilo de la composición es 1000 ppm o menos, preferentemente, 500 ppm o menos, con mayor preferencia, 200 ppm o menos y, con máxima preferencia, 100 ppm o menos, en donde cada una de las indicaciones de ppm se refiere a partes en peso y al peso total de la composición. La concentración de ácido acrílico de la composición al final de la bioconversión y/o el contenido de acrilonitrilo se pueden determinar mediante HPLC. Preferentemente, se usa un método de HPLC como se indica más adelante en los Ejemplos.

En consecuencia, la presente invención también se refiere a un método para preparar una solución acuosa de acrilamida, en donde el método comprende las siguientes etapas:

- (a) agregar los siguientes componentes (i) a (iii) a un reactor para obtener una composición para bioconversión:
 - (i) un biocatalizador capaz de convertir acrilonitrilo en acrilamida;
 - (ii) acrilonitrilo;
 - (iii) agua;

- (b) realizar una bioconversión en la composición obtenida en la etapa (a);
- (c) agregar más acrilonitrilo y mantener el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) a 0,3 % p/p o más, en donde la indicación de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor; y
- (d) obtener una composición, en donde la concentración de ácido acrílico de la composición al final de la bioconversión es 1500 ppm o menos, preferentemente, 1200 ppm o menos, con mayor preferencia, 1000 ppm o menos, con mayor preferencia, 750 ppm o menos, aun con mayor preferencia, 500 ppm o menos, aun con mayor preferencia, 300 ppm o menos, aun con mayor preferencia, 200 ppm o menos y, con máxima preferencia, 100 ppm o menos, en donde cada una de las indicaciones de ppm se refiere a partes en peso y cada una se refiere al peso total de la composición al final de la bioconversión.

En particular, los inventores descubrieron que realizando cualquiera de los métodos de la presente invención descritos en la presente, la concentración de ácido acrílico se puede reducir en al menos 10 %, preferentemente, en al menos 15 %, con mayor preferencia, en al menos 20 %, aun con mayor preferencia, en al menos 25 % y, con máxima preferencia, en al menos 35 %, en comparación con un método de referencia. En este contexto, la reducción de la concentración de ácido acrílico como se define en los métodos de la presente invención se refiere a la concentración final de ácido acrílico contenida en una solución acuosa de acrilamida preparada mediante el método de la presente invención (es decir, manteniendo el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) a 0,3 % p/p o más) en comparación con la concentración final de ácido acrílico contenida en una solución acuosa de acrilamida no preparada mediante los métodos de la presente invención (es decir, sin mantener el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) a 0,3 % p/p o más como se describe en la presente).

En cualquiera de los métodos descritos y proporcionados en la presente, el acrilonitrilo (componente (ii)) se agrega al reactor en la etapa (a). En el contexto de cualquiera de los métodos de la presente invención, el acrilonitrilo se puede agregar al reactor antes de que el agua se agregue, después de que el agua se agregue, o se puede agregar junto con el agua.

De acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente, se agrega más acrilonitrilo en la etapa (c). Al respecto, el acrilonitrilo se puede agregar de manera continua o intermitente. La adición de acrilonitrilo puede ser a una velocidad

de alimentación constante o variable, o en lotes. El acrilonitrilo se puede agregar en forma pura o en solución. Por ejemplo, se puede usar una solución acuosa de acrilonitrilo.

De manera adicional, en cualquiera de los métodos descritos y proporcionados en la presente, el agua (componente (iii)) se agrega al reactor en la etapa (a). El agua se puede agregar como tal, puede ser parte del biocatalizador como se describe en la presente, puede ser parte de una solución de acrilonitrilo como se describe en la presente, o se puede agregar de otra manera. En caso de que el agua se agregue como tal, se puede usar, en general, agua corriente o agua desionizada. El agua también puede ser parte de una composición acuosa, tal como una solución acuosa de una sal. En particular, se puede utilizar un amortiguador.

Para la etapa (a) de cualquiera de los métodos descritos y proporcionados en la presente, no es relevante en qué orden los componentes (i) a (iii) se agregan al reactor.

Con respecto a las cantidades de los componentes que se agregan, el biocatalizador, acrilonitrilo y agua se pueden agregar durante las etapas (a) a (c) de cualquiera de los métodos descritos en la presente en una relación en peso de 0,001 a 0,5 % p/p del biocatalizador, 22 a 45 % p/p de acrilonitrilo y un peso de equilibrio hasta 100 % p/p de agua; preferentemente, de 0,005 a 0,2 % p/p del biocatalizador, 26 a 42 % p/p de acrilonitrilo y un peso de equilibrio hasta 100 % p/p de agua; con mayor preferencia, de 0,01 a 0,1 % p/p del biocatalizador, 30 a 40 % p/p de acrilonitrilo y un peso de equilibrio hasta 100 % p/p de agua; con máxima preferencia, de 0,015 a 0,065 % p/p del biocatalizador, 35 a 39 % p/p de acrilonitrilo y un peso de equilibrio hasta 100 % p/p de agua, en donde, en cada caso, las indicaciones de % p/p se refieren al peso total (100 % p/p) de los pesos combinados de biocatalizador, acrilonitrilo y agua agregados durante las etapas (a) a (c). Por ejemplo, en el caso del acrilonitrilo, que se agrega en la etapa (a) y la etapa (c), esto significa que las cantidades combinadas de acrilonitrilo agregadas en las etapas (a) y (c) se usan para calcular la relación. Las indicaciones de % p/p de la relación del biocatalizador pueden indicar en cada caso la relación del biocatalizador en cuanto al peso seco del biocatalizador, en particular, en cuanto al peso celular seco del biocatalizador. El agua, que forma el peso de equilibrio hasta 100 % p/p, no está particularmente limitada. Por ejemplo, el agua puede ser una composición acuosa, tal como una solución acuosa de una sal. En particular, se puede usar un amortiguador. Sin embargo, se prefiere que el agua sea agua corriente o agua desionizada.

La etapa (b) de cualquiera de los métodos descritos y proporcionados en la presente representa la etapa de bioconversión durante la cual el acrilonitrilo se convierte en acrilamida mediante el biocatalizador descrito y ejemplificado en la presente. Más específicamente, en cualquiera de los métodos descritos en la presente, la bioconversión en la etapa (b) se puede realizar a una temperatura de 5 °C a 40 °C durante 10 minutos a 48 horas, preferentemente, a una temperatura de 5 °C a 35 °C durante 10 minutos a 48 horas, con mayor preferencia, a una temperatura de 15 °C a 30 °C durante 10 minutos a 48 horas y, con máxima preferencia, a una temperatura a 20 °C a 28 °C durante 10 minutos a 48 horas. En particular, las temperaturas de reacción se prefieren desde el punto de vista de la alta actividad del biocatalizador y los tiempos de reacción razonables. El tiempo real que se debe aplicar para la etapa (b) también depende del contenido de acrilamida deseado de la solución acuosa de acrilamida que se debe producir.

Además o independientemente de estas condiciones de temperatura y tiempo, en cualquiera de los métodos de la presente invención, el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) se puede mantener a 0,3 % p/p o más durante 10 minutos a 48 horas, preferentemente, durante 15 minutos a 24 horas, con mayor preferencia, durante 30 minutos a 18 horas y, con máxima preferencia, durante 1 hora a 12 horas. En particular, el contenido de acrilonitrilo se puede mantener a 0,3 % p/p o más durante 2 horas a 12 horas, durante 4 horas a 12 horas, durante 6 horas a 12 horas, durante 8 horas a 12 horas o durante 10 horas a 12 horas durante la etapa (b).

De acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente, el contenido de acrilonitrilo se puede mantener durante la etapa (b) a 0,3 p/p o más hasta que se alcanza un contenido de acrilamida de al menos 20 % p/p, preferentemente, de al menos 25 % p/p, con mayor preferencia, de al menos 30 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 35 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 40 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 42,5 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 45 % p/p, aun con mayor preferencia, de al menos 47,5 % p/p y, con máxima preferencia, de al menos 50 % p/p, en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor. Después de que se alcanza ese contenido de acrilamida, la adición de acrilonitrilo se puede detener. En cualquiera de los métodos descritos en la presente, el contenido de acrilamida de la composición en el reactor se puede medir usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Como se indicó anteriormente, en cualquiera de los métodos de la presente

invención, el contenido de acrilonitrilo durante la bioconversión de la etapa (b) se mantiene a 0,3 % p/p o más. Preferentemente, el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) se mantiene a 0,4 % p/p o más, con mayor preferencia, a 0,5 % p/p o más, aun con mayor preferencia, a 0,6 % p/p o más, aun con mayor preferencia, a 0,8 % p/p o más y, con máxima preferencia, a 1,0 % p/p o más, en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor. Al respecto, los inventores descubrieron que aumentando el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) la concentración de ácido acrílico se puede reducir aún más.

Además de mantener un valor mínimo del contenido de acrilonitrilo, en cualquiera de los métodos descritos en la presente, el contenido de acrilonitrilo se mantiene preferentemente durante la etapa (b) a 6 % p/p o menos, preferentemente, a 5 % p/p o menos, con mayor preferencia, a 4 % p/p o menos, con máxima preferencia, a 3 % p/p o menos, en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor. Los inventores descubrieron que mantener el contenido de acrilonitrilo por debajo del límite superior permite una excelente actividad del biocatalizador y una reducción eficaz de la concentración de ácido acrílico en la solución acuosa de acrilamida obtenida. Asimismo, se puede producir una pérdida de actividad del biocatalizador en caso de que el contenido de acrilonitrilo exceda el valor de 6 % p/p. En particular, el contenido de acrilonitrilo se puede mantener durante la etapa (b) dentro del rango de 0,3 % p/p a 6 % p/p, preferentemente, de 0,4 % p/p a 5 % p/p, con mayor preferencia, de 0,5 % p/p a 4 % p/p, aun con mayor preferencia, de 0,6 % p/p a 3 % p/p, aun con mayor preferencia, de 0,8 % p/p a 3 % p/p, con máxima preferencia, de 1,0 % p/p a 3 % p/p, en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor.

De acuerdo con una forma de realización de cualquiera de los métodos de la presente invención, en particular, de cualquiera de los métodos para preparar una solución acuosa de acrilamida, el contenido de acrilonitrilo no es 2 % p/p durante la adición de acrilonitrilo, en donde la indicación de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor. En particular, esto es válido para la adición de acrilonitrilo de acuerdo con la etapa (c).

Como se indicó anteriormente, la actividad del biocatalizador puede disminuir en caso de que un contenido alto de acrilonitrilo se mantenga durante la bioconversión de la etapa (b). Al respecto, los inventores descubrieron que una pérdida de actividad del biocatalizador durante la bioconversión disminuye si, después de mantener el contenido de acrilonitrilo en un primer rango durante un primer período, el contenido

de acrilonitrilo se reduce a un segundo rango y se mantiene en el segundo rango durante un segundo período. En consecuencia, a fin de lograr una alta actividad del biocatalizador y, por lo tanto, tiempos de reacción razonables, en cualquiera de los métodos descritos en la presente, mantener el contenido de acrilonitrilo a 0,3 % p/p o más durante la etapa (b) puede comprender:

- (i) mantener un contenido de acrilonitrilo en un primer rango durante un primer período;
- (ii) reducir el contenido de acrilonitrilo a un segundo rango; y
- (iii) mantener un contenido de acrilonitrilo en un segundo rango durante un segundo período.

En particular, usando este protocolo, que comprende reducir el contenido de acrilonitrilo durante la bioconversión, se puede alcanzar la conversión sustancialmente total de acrilonitrilo en acrilamida en los métodos descritos en la presente.

Preferentemente, la etapa (b) de cualquiera de los métodos de la presente invención, en donde un contenido de acrilonitrilo se mantiene en un primer rango durante un primer período, el contenido de acrilonitrilo se reduce a un segundo rango, y el contenido de acrilonitrilo se mantiene en un segundo rango durante un segundo período, comprende:

- (i) mantener un contenido de acrilonitrilo en un primer rango de 1,2 % p/p a 6 % p/p durante un primer período de 30 minutos a 4 horas;
- (ii) reducir el contenido de acrilonitrilo a un segundo rango; y
- (iii) mantener un contenido de acrilonitrilo en un segundo rango de 0,3 % p/p a 1,2 % p/p durante un segundo período de 30 minutos a 24 horas,

en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor.

Con mayor preferencia, la etapa (b) de cualquiera de los métodos descritos en la presente comprende:

- (i) mantener un contenido de acrilonitrilo en un primer rango de 1,2 % p/p a 4 % p/p durante un primer período de 30 minutos a 3 horas;
- (ii) reducir el contenido de acrilonitrilo a un segundo rango; y
- (iii) mantener un contenido de acrilonitrilo en un segundo rango de 0,5 % p/p a 1,1 % p/p durante un segundo período de 30 minutos a 12 horas,

en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor.

Con máxima preferencia, la etapa (b) de cualquiera de los métodos de la

presente invención comprende:

- (i) mantener un contenido de acrilonitrilo en un primer rango de 1,3 % p/p a 3 % p/p durante un primer período de 30 minutos a 2 horas;
- (ii) reducir el contenido de acrilonitrilo a un segundo rango; y
- (iii) mantener un contenido de acrilonitrilo en un segundo rango de 0,6 % p/p a 1,0 % p/p durante un segundo período de 1 hora a 8 horas, preferentemente, de 1 hora a 5 horas,

en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de la composición en el reactor.

Cualquiera de los métodos descritos en la presente se puede realizar usando un proceso continuo. En particular, la expresión “proceso continuo”, como se usa en la presente, se refiere a un método en donde una solución acuosa de acrilamida se produce de manera continua sin recolectar toda la mezcla de reacción en el reactor. Esto significa que las materias primas para la reacción, que pueden comprender el biocatalizador, agua y acrilonitrilo, se cargan al reactor de manera continua o intermitente y que el producto obtenido se recupera del reactor de manera continua o intermitente.

De manera alternativa, cualquiera de los métodos de la presente invención se puede realizar usando un proceso por semilotes. En particular, la expresión “proceso por semilotes”, como se usa en la presente, puede comprender que una solución acuosa de acrilamida se produzca de manera discontinua. De acuerdo con un ejemplo no limitativo para llevar a cabo el proceso por semilotes, se colocan agua, una cantidad determinada de acrilonitrilo y el biocatalizador en un reactor. Luego se agrega más acrilonitrilo durante la bioconversión hasta que se alcanza un contenido de acrilamida deseado de la composición. Después de que se alcanza el contenido de acrilamida deseado, la composición obtenida se recupera por completo del reactor, antes de que se coloquen nuevos reactivos.

Con respecto a la carga de acrilonitrilo durante la bioconversión en la etapa (b), de acuerdo con una forma de realización no limitativa de cualquiera de los métodos de la presente invención, el acrilonitrilo se puede cargar de manera que el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) se mantenga dentro de un rango de ± 10 % p/p, preferentemente, de ± 5 % p/p, con mayor preferencia, de ± 2 % p/p, con máxima preferencia, de ± 1 % p/p de un valor predeterminado del contenido de acrilonitrilo, en donde cada una de las indicaciones de % p/p se refiere al peso total de acrilonitrilo en el reactor. En particular, en cualquiera de los métodos de la presente invención, el

acrilonitrilo se puede cargar de manera que el contenido de acrilonitrilo durante la etapa (b) se mantenga sustancialmente constante en un valor predeterminado.

En general, en cualquiera de los métodos de la presente invención, el contenido de acrilonitrilo y/o el contenido de acrilamida durante la etapa (b) se pueden medir usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). En particular, el contenido de acrilonitrilo y/o el contenido de acrilamida se pueden medir en línea usando FTIR.

De acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención, el biocatalizador capaz de convertir acrilonitrilo en acrilamida puede ser un microorganismo que codifica la enzima nitrilo hidratasa. Al respecto, no es relevante para la presente invención si el microorganismo codifica de manera natural nitrilo hidratasa, o si se sometió a ingeniería genética para codificar la enzima, o si un microorganismo que codifica de manera natural nitrilo hidratasa se modificó para que pueda producir más nitrilo hidratasa y/o nitrilo hidratasa mejorada. Como se usa en la presente, la expresión “biocatalizador (por ejemplo, microorganismo) *que codifica* (la enzima) nitrilo hidratasa” o similar significa generalmente que el microorganismo puede, en general, producir y mantener de manera estable nitrilo hidratasa. Esto quiere decir que, como se usa en la presente y como la persona del oficio de nivel medio comprende fácilmente, un biocatalizador (por ejemplo, un microorganismo) que se desea usar de acuerdo con la presente invención que codifica (de manera natural o no natural) nitrilo hidratasa también es capaz en general de producir y mantener de manera estable nitrilo hidratasa. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, también es posible que estos microorganismos solo produzcan nitrilo hidratasa durante el cultivo (o fermentación) del microorganismo - y así luego contienen nitrilo hidratasa - antes de que se agreguen a un reactor de acuerdo con la etapa (a) de cualquiera de los métodos descritos y proporcionados en la presente. En ese caso, es posible que los microorganismos no produzcan más nitrilo hidratasa durante los métodos descritos y proporcionados en la presente, sino que actúen solo mediante las unidades de nitrilo hidratasa que produjeron antes y que aun contienen. Como lo comprenderán fácilmente las personas del oficio de nivel medio, también es posible que algunas moléculas de nitrilo hidratasa puedan salir del microorganismo (por ejemplo, debido a lisis del microorganismo) y actuar libremente en la solución como biocatalizador. Como tal, también es posible que el término “biocatalizador”, como se usa en la presente, abarque la enzima nitrilo hidratasa en sí misma, siempre que pueda convertir acrilonitrilo en acrilamida como se describe y se ejemplifica en la presente. En el

contexto de la presente invención, también es posible utilizar directamente nitrilo hidratasa como biocatalizador.

En el contexto de la presente invención, los microorganismos que codifican de manera natural nitrilo hidratasa, que se pueden usar como biocatalizadores en cualquiera de los métodos descritos en la presente, comprenden las especies que pertenecen a un género seleccionado del grupo que consiste en *Rhodococcus*, *Aspergillus*, *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Escherichia*, *Geobacillus*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Serratia*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Comomonas* y *Pyrococcus*. En formas de realización preferidas de la invención, el biocatalizador se selecciona de bacterias de los géneros *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* y *Geobacillus*.

Los biocatalizadores preferidos que se desean usar en el contexto de cualquiera de los métodos de la presente invención comprenden representantes del género *Rhodococcus*. Las especies adecuadas como biocatalizadores que se desean usar en el contexto de cualquiera de los métodos de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, *Rhodococcus rhodochrous* (por ejemplo, NCIMB 41164, J1/FERM-BP 1478, M33 o M8), *Rhodococcus pyridinovorans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus opacus*, *Aspergillus niger*, *Acidovorax avenae*, *Acidovorax facilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pallidus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus* sp BR449, *Bradyrhizobium oligotrophicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Escherichia coli*, *Geobacillus* sp. RAPc8, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella variicola*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium opportunistum*, *Mesorhizobium* sp F28, *Moraxella*, *Pantoea endophytica*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* sp CH1, *Brevibacterium* sp CH2, *Brevibacterium* sp R312, *Brevibacterium imperiale*, *Brevibacterium casei*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium hoffmanii*, *Microbacterium imperiale*, *Microbacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus*,

Nocardia globerula, *Nocardia rhodochrous*, *Nocardia* sp 163, *Pseudonocardia thermophila*, *Trichoderma*, *Myrothecium verrucaria*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus* sp UFMG- Y28, *Debaryomyces hanseii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum* sp JR1, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula glutinis*, *Comomonas testosteroni*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus* o *Pyrococcus horikoshii*.

De acuerdo con una forma de realización de cualquiera de los métodos de la presente invención, el biocatalizador que se desea usar pertenece a la especie *Rhodococcus rhodochrous*. Los ejemplos particulares de cepas que pertenecen a *Rhodococcus rhodochrous* que se pueden usar en el contexto de cualquiera de los métodos descritos en la presente comprenden NCIMB 41164, J1 (FERM-BP 1478), M33 y M8.

De manera adicional o alternativa a *Rhodococcus rhodochrous*, el biocatalizador utilizado en cualquiera de los métodos descritos en la presente puede ser *Rhodococcus pyridinovorans*.

En el contexto de la presente invención, los microorganismos que codifican nitrilo hidratasa que no codifican nitrilo hidratasa de manera natural pueden ser microorganismos modificados por ingeniería genética que no contienen de manera natural un gen que codifica nitrilo hidratasa, pero que fueron manipulados para contener un polinucleótido que codifica una nitrilo hidratasa (por ejemplo, mediante transformación, transducción, transfección, conjugación u otros métodos adecuados para transferir o insertar un polinucleótido dentro de una célula que son conocidos en el estado de la técnica; cf. Sambrook y Russell 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU.), permitiendo así a los microorganismos producir y mantener de manera estable la enzima nitrilo hidratasa. Con este fin, puede ser necesario insertar polinucleótidos adicionales que pueden ser necesarios para permitir la transcripción y traducción del gen o mRNA de nitrilo hidratasa, respectivamente. Estos polinucleótidos adicionales pueden comprender, entre otros, secuencias promotoras, colas poliT o poliU, u orígenes de replicación u otras secuencias de control de plásmidos. En este contexto, los microorganismos modificados por ingeniería genética que no contienen de manera natural un gen que codifica una nitrilo hidratasa pero que fueron manipulados para contener un polinucleótido que codifica una nitrilo hidratasa pueden ser microorganismos procariotas o eucariotas. Los ejemplos de microorganismos procariotas incluyen, por

ejemplo, representantes de la especie *Escherichia coli*. Los ejemplos de microorganismos eucariotas incluyen, por ejemplo, levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*).

En el contexto de la presente invención, la expresión “nitrilo hidratasa” (también denominada en la presente NHasa) significa generalmente una enzima que es capaz de catalizar la conversión (es decir, hidratación) de acrilonitrilo en acrilamida. La enzima puede ser, por ejemplo, la enzima registrada con la nomenclatura IUBMB desde el 30 de septiembre de 2014: EC 4.2.1.84; N.º CAS 2391-37-5. Sin embargo, la expresión “nitrilo hidratasa”, como se usa en la presente, también abarca enzimas modificadas o mejoradas que, por ejemplo, son capaces de convertir acrilonitrilo en acrilamida más rápidamente, o que se pueden producir en una relación rendimiento/tiempo más alta, o que son más estables, siempre que sean capaces de catalizar la conversión (es decir, hidratación) de acrilonitrilo en acrilamida. Los métodos para determinar la capacidad de un determinado biocatalizador (por ejemplo, microorganismo o enzima) de catalizar la conversión de acrilonitrilo en acrilamida se conocen en el estado de la técnica. A modo de ejemplo, en el contexto de la presente invención, la actividad de un determinado biocatalizador de actuar como una nitrilo hidratasa en el sentido de la presente invención se puede determinar de la siguiente manera: En primer lugar, haciendo reaccionar 100 µl de una suspensión celular, un lisado celular, un polvo de enzima disuelto o cualquier otra preparación que contenga la supuesta nitrilo hidratasa con 875 µl de 50 mM de un amortiguador de fosfato de potasio y 25 µl de acrilonitrilo a 25 °C en un agitador de tubos Eppendorf a 1.000 rpm durante 10 minutos. Después de 10 minutos de tiempo de reacción, las muestras se pueden retirar e inactivar inmediatamente agregando el mismo volumen de 1,4 % de ácido clorhídrico. Después de mezclar la muestra, las células se pueden retirar mediante centrifugación durante 1 minuto a 10.000 rpm, y la cantidad de acrilamida formada se determina analizando el sobrenadante transparente mediante HPLC. Para afirmar que una enzima es una nitrilo hidratasa en el contexto de la presente invención, la concentración de acrilamida debe ser entre 0,25 y 1,25 mmol/l - de ser necesario, la muestra se debe diluir en consecuencia, y la conversión se debe repetir. La actividad de la enzima luego se puede deducir de la concentración de acrilamida dividiendo la concentración de acrilamida derivada del análisis de HPLC por el tiempo de reacción, que fue de 10 minutos, y multiplicando este valor por el factor de dilución entre la muestra de HPLC y la muestra original. Las actividades >5 U/mg de peso celular seco, preferentemente, >25 U/mg de peso celular seco, con mayor preferencia,

>50 U/mg de peso celular seco, con máxima preferencia, >100 U/mg de peso celular seco indican la presencia de una nitrilo hidratasa expresada funcionalmente y se consideran como nitrilo hidratasa en el contexto de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, la nitrilo hidratasa puede ser un polipéptido codificado mediante un polinucleótido que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que es al menos 70 %, preferentemente, al menos 75 %, con mayor preferencia, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 85 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, con mayor preferencia, al menos 95 %, con mayor preferencia, al menos 96 %, con mayor preferencia, al menos 97 %, con mayor preferencia, al menos 98 %, con mayor preferencia, al menos 99 %, con mayor preferencia, al menos 99,5 % y, con máxima preferencia, 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 (subunidad alfa de nitrilo hidratasa de *R. rhodochrous*:

GTGAGCGAGCACGTCAATAAGTACACGGAGTACGAGGCACGTACCAAGGCGATC
GAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTCATCACGCCCGCCGCGGTGACCGAGTC
GTTTCGTACTACGAGAACGAGATCGGCCCGATGGGCGGTGCCAAGGTCGTGGCC
AAGTCCTGGGTGGACCCTGAGTACCGCAAGTGGCTCGAAGAGGACGCGACGGC
CGCGATGGCGTCATTGGGCTATGCCGGTGAGCAGGCACACCAAATTTGGGCGGT
CTTCAACGACTCCCAAACGCATCACGTGGTGGTGTGCACTCTGTGTTTCGTGCTAT
CCGTGGCCGGTGCTTGGTCTCCCGCCCGCCTGGTACAAGAGCATGGAGTACCGG
TCCCGAGTGGTAGCGGACCCTCGTGGAGTGCTCAAGCGCGATTTTCGTTTTCGAC
ATCCCGATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAGCTCCGAAATCCGCTAC
ATCGTCATCCCGGAACGGCCGGCCGGCACCGACGGTTGGTCCGAGGAGGAGCT
GACGAAGCTGGTGAGCCGGGACTCGATGATCGGTGTCAGTAATGCGCTCACACC
GCAGGAAGTGATCGTATGA) y/o a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3
(subunidad beta de nitrilo hidratasa de *R. rhodochrous*:
ATGGATGGTATCCACGACACAGGCGGCATGACCGGATACGGACCGGTCCCCTAT
CAGAAGGACGAGCCCTTCTTCCACTACGAGTGGGAGGGTCGGACCCTGTCAATT
CTGACTTGGATGCATCTCAAGGGCATATCGTGGTGGGACAAGTCGCGGTTCTTCC
GGGAGTCGATGGGGAACGAAAACACTACGTCAACGAGATTCGCAACTCGTACTACAC
CCACTGGCTGAGTGCGGCAGAACGTATCCTCGTCGCCGACAAGATCATCACCGA
AGAAGAGCGAAAGCACCGTGTGCAAGAGATCCTTGAGGGTCGGTACACGGACAG
GAAGCCGTCGCGGAAGTTCGATCCGGCCCGATCGAGAAGGCGATCGAACGGCT
TCACGAGCCCCACTCCCTAGCGCTTCCAGGAGCGGAGCCGAGTTTCTCTCTCGG
TGACAAGATCAAAGTGAAGAGTATGAACCCGCTGGGACACACACGGTGCCCGAA

ATATGTGCGGAACAAGATCGGGGAAATCGTCGCCTACCACGGCTGCCAGATCTAT
 CCCGAGAGCAGCTCCGCCGGCCTCGGCGACGATCCTCGCCCGCTCTACACGGT
 CGCGTTTTCCGCCAGGAAGTGTGGGGCGACGACGGAAACGGGAAAGACGTAGT
 GTGCGTCGATCTCTGGGAACCGTACCTGATCTCTGCGTGA), siempre que el
 polipéptido codificado mediante el polinucleótido sea capaz de catalizar la hidratación
 de acrilonitrilo para obtener acrilamida (es decir, tiene actividad de nitrilo hidratasa)
 como se describe y ejemplifica en la presente. También en el contexto de la presente
 invención, la nitrilo hidratasa puede ser un polipéptido que comprende o consiste en
 una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, preferentemente, al menos 75
 %, con mayor preferencia, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 85 %, con
 mayor preferencia, al menos 90 %, con mayor preferencia, al menos 95 %, con mayor
 preferencia, al menos 96 %, con mayor preferencia, al menos 97 %, con mayor
 preferencia, al menos 98 %, con mayor preferencia, al menos 99 %, con mayor
 preferencia, al menos 99,5 % y, con máxima preferencia, 100 % idéntica a la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (subunidad alfa de nitrilo hidratasa de *R.
 rhodochrous*: VSEHVNKYTE YEARTKAIET LLYERGLITP AAVDRVVSYY
 ENEIGPMGGA KVVAKSWVDP EYRKWLEEDA TAAMASLGYA GEQAHQISAV
 FNDSQTHHV VCTLCSYPW PVLGLPPAWY KSMEYRSRVV ADPRGVLKRD
 FGFDIPDEVE VRVWDSSEI RYIVIPERPA GTDGWSEEL TKLVSRDSMI
 GVSNALTPQE VIV) y/o a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (subunidad
 beta de nitrilo hidratasa de *R. rhodochrous*: MDGIHDTGGM TGYGPVPYQK
 DEPFHFEWE GRTLSILTWM HLKGISWWDK SRFFRESMGN ENYVNEIRNSY
 YTHWLSAAE RILVADKIIT EEERKHRVQE ILEGRYTDRK PSRKFDPAQI
 EKAIERLHEP HSLALPGAEP SFSLGDKIKV KSMNPLGHTR CPKYVRNKIG
 EIVAYHGCQI YPESSAGLG DDPRLPYTVA FSAQELWGDD GNGKDVVCVD
 LWEPYLISA), siempre que el polipéptido sea capaz de catalizar la hidratación de
 acrilonitrilo para obtener acrilamida como se describe y ejemplifica en la presente.

El nivel de identidad entre dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de
 ácido nucleicos o secuencias de aminoácidos) se puede determinar fácilmente
 mediante métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante
 análisis BLAST. En general, en el contexto de la presente invención, si dos secuencias
 (por ejemplo, secuencias de polinucleótidos o secuencias de aminoácidos) que se
 deben comparar mediante, por ejemplo, comparaciones de secuencia, difieren en
 identidad, entonces el término "identidad" se puede referir a la secuencia más corta y a
 la parte de la secuencia más larga que coincide con la secuencia más corta. Por lo

tanto, cuando las secuencias que se comparan no tienen la misma longitud, el grado de identidad se puede referir, preferentemente, al porcentaje de residuos de nucleótidos en la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de nucleótidos en la secuencia más larga o al porcentaje de nucleótidos en la secuencia más larga que son idénticos a la secuencia de nucleótidos en la secuencia más corta. En este contexto, la persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente la parte de una secuencia más larga que coincide con la secuencia más corta. Además, como se usa en la presente, los niveles de identidad de las secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos se pueden referir a la longitud total de la secuencia respectiva y, preferentemente, se evalúan en pares, en donde cada espacio se debe contar como un error de apareamiento. Estas definiciones para comparaciones de secuencias (por ejemplo, establecimiento de valores de "identidad") se deben aplicar a todas las secuencias descritas en la presente.

Asimismo, el término "identidad", como se usa en la presente, significa que existe una equivalencia funcional y/o estructural entre las secuencias correspondientes. Las secuencias de ácidos nucleicos/aminoácidos que tienen los niveles de identidad determinados con las secuencias de ácidos nucleicos/aminoácidos particulares descritas en la presente pueden representar derivados/variantes de estas secuencias que, preferentemente, tienen la misma función biológica. Pueden ser variaciones naturales, por ejemplo, secuencias de otras variedades, especies, etc., o mutaciones, y dichas mutaciones se pueden haber formado naturalmente o pueden haber sido producidas mediante mutagénesis deliberada. Además, las variaciones pueden ser secuencias producidas sintéticamente. Las variantes pueden ser variantes naturales o variantes producidas sintéticamente o variantes producidas mediante técnicas de ADN recombinante. Las desviaciones de las secuencias de ácidos nucleicos descritas anteriormente se pueden haber producido, por ejemplo, mediante eliminación, sustitución, adición, inserción y/o recombinación. El término "adición" se refiere a agregar al menos un residuo de ácido nucleico/aminoácido al extremo de la secuencia determinada, mientras que "inserción" se refiere a insertar al menos un residuo de ácido nucleico/aminoácido dentro de una secuencia determinada. El término "eliminación" se refiere a eliminar o retirar al menos un residuo de ácido nucleico o un residuo de aminoácido en una secuencia determinada. El término "sustitución" se refiere al reemplazo de al menos un residuo de ácido nucleico/residuo de aminoácido en una secuencia determinada. De nuevo, estas definiciones como se usan en la presente

aplican, *mutatis mutandis*, para todas las secuencias proporcionadas y descritas en la presente.

En general, como se usan en la presente, los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se deben interpretar como sinónimos. En general, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender, entre otros, moléculas de ADN, moléculas de ARN, tiofosfatos de oligonucleótido, ribo-oligonucleótidos sustituidos o moléculas de APN. Asimismo, la expresión “molécula de ácido nucleico” se puede referir a ADN o ARN, o híbridos de estos o cualquier modificación de estos que se conoce en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, US 5525711, US 471 1955, US 5792608 o EP 302175 para ejemplos de modificaciones). La secuencia de polinucleótidos puede ser monocatenaria o bicatenaria, lineal o circular, natural o sintética, y sin limitación de tamaño. Por ejemplo, la secuencia de polinucleótidos puede ser ADN genómico, cADN, ADN mitocondrial, mARN, ARN antisentido, ARN ribosómico o un ADN que codifica tales ARN o quimeroplastos (Gamper, Nucleic Acids Research, 2000, 28, 4332 - 4339). Esta secuencia de polinucleótidos puede ser en forma de vector, plásmido o de ADN o ARN virales. En la presente también se describen moléculas de ácido nucleico que son complementarias a las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente y moléculas de ácido nucleico que se pueden hibridar con moléculas de ácido nucleico descritas en la presente. Una molécula de ácido nucleico descrita en la presente también puede ser un fragmento de las moléculas de ácido nucleico en el contexto de la presente invención. En particular, tal fragmento es un fragmento funcional. Los ejemplos de tales fragmentos funcionales son moléculas de ácido nucleico que pueden funcionar como cebadores.

Cuando se agrega el biocatalizador al reactor en cualquiera de los métodos de la presente invención, el biocatalizador se puede tomar directamente del caldo de fermentación. También se prevé que el biocatalizador se puede usar en forma de un caldo de fermentación en los métodos descritos en la presente. Por ende, el biocatalizador no necesita aislarse del caldo de fermentación, y se puede usar un caldo de fermentación que comprende el biocatalizador para la bioconversión. Por ejemplo, un caldo de fermentación que comprende el biocatalizador se puede agregar al reactor en la etapa (a) de los métodos de la presente invención. De manera alternativa, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente, el biocatalizador se puede haber secado antes de agregarlo al reactor. En este contexto, el término “antes” no necesariamente significa que el biocatalizador se secó y luego se agregó directamente al reactor. Basta con que el biocatalizador se haya sometido a

una etapa de secado en cualquier momento antes de agregarlo al reactor, independientemente de que se realicen o no etapas adicionales entre el secado y la adición. Como ejemplos no limitativos, tales etapas adicionales entre la etapa de secado y la adición al reactor pueden ser almacenamiento o reconstitución. Sin embargo, también es posible agregar el biocatalizador al reactor directamente después del secado. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que, usando un biocatalizador que se sometió a una etapa de secado, la concentración de ácido acrílico en una solución acuosa de acrilamida obtenida mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente se reduce aún más en comparación con el caso en que se usa un biocatalizador que no se sometió a secado antes de usarse en la bioconversión.

Con respecto al método de secado, en cualquiera de los métodos descritos y proporcionados en la presente, se puede usar un biocatalizador que se secó usando liofilización, secado por pulverización, secado por calor, secado al vacío, secado en lecho fluidizado y/o granulación por pulverización. Con respecto a esto, se prefieren el secado por pulverización y la liofilización, dado que, en general, usando un biocatalizador que se sometió a secado por pulverización o liofilización, se logra una mayor reducción de la concentración de ácido acrílico en las soluciones acuosas de acrilamida obtenidas en comparación con el uso de un biocatalizador que se secó usando otros métodos.

De acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención, se puede agregar un biocatalizador seco al reactor. Esto significa que el biocatalizador se agrega al reactor en forma seca. En particular, el biocatalizador puede tener forma de polvo o gránulo. Como alternativa a la adición de un biocatalizador seco al reactor, el biocatalizador seco se puede reconstituir antes de agregarlo al reactor. Por ejemplo, el biocatalizador se puede reconstituir mediante suspensión en una composición acuosa. Con respecto a esto, la composición acuosa puede ser agua o un amortiguador. Como alternativa adicional, un biocatalizador en forma de un microorganismo unido a la matriz se puede agregar al reactor.

Como se usa en la presente, la expresión “biocatalizador seco” se refiere a un biocatalizador que se sometió a una etapa de secado. En general, un biocatalizador seco tiene un contenido de humedad de menos de alrededor de 20 % p/p, con mayor preferencia, de menos de alrededor de 15 % p/p, aun con mayor preferencia, de menos de alrededor de 14 % p/p, con máxima preferencia, de alrededor de 5 a alrededor de 10 % p/p en función del peso total de la muestra de biocatalizador. Los

métodos para determinar el contenido de humedad son conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, el contenido de humedad de una muestra de biocatalizador seco se puede determinar mediante análisis termogravimétrico. Al comienzo del análisis termogravimétrico, se determina el peso inicial de la muestra. La muestra luego se calienta, y la humedad se evapora. El calentamiento continúa hasta que el peso de la muestra permanece constante. La diferencia entre el peso constante al final del análisis y el peso inicial representa la cantidad de agua evaporada durante el análisis, que permite el cálculo del contenido de humedad de la muestra. Para determinar el contenido de humedad mediante análisis termogravimétrico, la muestra de biocatalizador se puede analizar, por ejemplo, en un analizador halógeno de humedad Mettler Toledo HB43-S, operado a 130 °C hasta que el peso de la muestra permanezca constante durante al menos 30 segundos.

Al llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en la presente, se puede obtener la solución acuosa de acrilamida junto con el biocatalizador. En consecuencia, el biocatalizador se puede separar de la solución acuosa de acrilamida obtenida. Esta separación del biocatalizador se puede realizar con respecto a las aplicaciones deseadas, que pueden incluir, por ejemplo, la homopolimerización o copolimerización de acrilamida. Los métodos adecuados para la separación del biocatalizador se conocen en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, centrifugación, sedimentación (por ejemplo, con floculación), separación por membranas y filtración.

La presente invención también se refiere a soluciones acuosas de acrilamida que se pueden obtener o que se obtienen mediante cualquiera de los métodos descritos y proporcionados en la presente.

Una solución acuosa de acrilamida, en particular, una solución acuosa de acrilamida que se puede obtener o que se obtiene mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente, puede contener 35 a 65 % p/p de acrilamida y puede tener una concentración de ácido acrílico de no más de 1500 ppm, preferentemente, de no más de 1000 ppm, con mayor preferencia, de no más de 750 ppm, con mayor preferencia, de no más de 500 ppm, aun con mayor preferencia, de no más de 300 ppm, aun con mayor preferencia, de no más de 200 ppm y, con máxima preferencia, de no más de 100 ppm, en donde cada una de las indicaciones de % p/p y ppm se refiere al peso total de la solución, y cada ppm se refiere a partes en peso.

Preferentemente, la solución acuosa de acrilamida contiene 40 a 60 % p/p de acrilamida y tiene una concentración de ácido acrílico de no más de 1500 ppm,

preferentemente, de no más de 1000 ppm, con mayor preferencia, de no más de 750 ppm, con mayor preferencia, de no más de 500 ppm, aun con mayor preferencia, de no más de 300 ppm, aun con mayor preferencia, de no más de 200 ppm y, con máxima preferencia, de no más de 100 ppm, en donde cada una las indicaciones de % p/p y ppm se refiere al peso total de la solución, y cada ppm se refiere a partes en peso.

Con mayor preferencia, la acrilamida acuosa contiene 45 a 55 % p/p de acrilamida y tiene una concentración de ácido acrílico de no más de 1500 ppm, preferentemente, de no más de 1000 ppm, con mayor preferencia, de no más de 750 ppm, con mayor preferencia, de no más de 500 ppm, aun con mayor preferencia, de no más de 300 ppm, aun con mayor preferencia, de no más de 200 ppm y, con máxima preferencia, de no más de 100 ppm, en donde cada una de las indicaciones de % p/p y ppm se refiere al peso total de la solución, y cada ppm se refiere a partes en peso.

Con máxima preferencia, la solución acuosa de acrilamida contiene 50 a 54 % p/p de acrilamida y tiene una concentración de ácido acrílico de no más de 1500 ppm, preferentemente, de no más de 1000 ppm, con mayor preferencia, de no más de 750 ppm, con mayor preferencia, de no más de 500 ppm, aun con mayor preferencia, de no más de 300 ppm, aun con mayor preferencia, de no más de 200 ppm y, con máxima preferencia, de no más de 100 ppm, en donde cada una de las indicaciones de % p/p y ppm se refiere al peso total de la solución, y cada ppm se refiere a partes en peso.

En cualquiera de las soluciones acuosas de acrilamida, el contenido de acrilamida y/o la concentración de ácido acrílico se pueden determinar usando HPLC. Preferentemente, se usa un método de HPLC como se indica más adelante en los Ejemplos.

Además, la presente invención se refiere a un homopolímero o copolímero de acrilamida que se puede obtener o que se obtiene mediante polimerización de la acrilamida de la solución acuosa como se describe en la presente. Con respecto a esto, en el caso de un homopolímero, el término "polimerización" se refiere a una reacción de homopolimerización, mientras que en el caso de un copolímero, el término "polimerización" se refiere a una reacción de copolimerización. La homopolimerización o copolimerización se puede llevar a cabo usando una solución acuosa de acrilamida que se puede obtener o que se obtiene mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente. En particular, se puede usar una solución acuosa de acrilamida, de la

cual se separó el biocatalizador antes de la polimerización. De manera alternativa, la acrilamida puede haber sido aislada de la solución acuosa de acrilamida antes de someterla a homopolimerización o copolimerización.

Un homopolímero o copolímero de acrilamida, en particular, un homopolímero o copolímero de acrilamida que se puede obtener o que se obtiene mediante polimerización de la acrilamida de la solución acuosa como se describe en la presente, puede tener un contenido de ácido acrílico de 60.000 ppm o menos, preferentemente, de 20.000 ppm o menos, con mayor preferencia, de 10.000 ppm o menos, y con máxima preferencia, de 2000 ppm o menos, en donde cada una de las indicaciones de ppm se refiere a partes en peso y al peso total del homopolímero o copolímero de acrilamida sólido.

El contenido alto de ácido acrílico dentro de las soluciones de acrilamida puede reducir el rendimiento de los homopolímeros y copolímeros de poliacrilamida resultantes, en especial, para productos de poliacrilamida catiónica, es decir, copolímeros de acrilamida con comonómeros catiónicos. Esto es muy evidente para copolímeros catiónicos con bajo contenido de comonómeros catiónicos. Sin pretender limitarse a ninguna teoría, las cantidades equivalentes molares de ácido acrílico aniónico y los comonómeros catiónicos dentro de la cadena de copolímeros producen complejos de carga. Esto puede afectar significativamente las propiedades físicas del material de poliacrilamida, y así se reduce la solubilidad y el rendimiento en aplicaciones tales como tratamiento de agua, fabricación de papel, recuperación de petróleo o minería.

Con respecto a este impacto del ácido acrílico, el homopolímero o copolímero de acrilamida descrito y proporcionado en la presente es, preferentemente, una poliacrilamida catiónica. Como conoce generalmente una persona del oficio de nivel medio, la expresión "poliacrilamida catiónica" indica un copolímero que, además de monómeros de acrilamida, contiene comonómeros catiónicos, tales como comonómeros que comprenden grupos amonio cuaternarios. Se prefiere, en particular, una poliacrilamida catiónica que tiene un contenido de ácido acrílico de 60.000 ppm o menos, preferentemente, de 20.000 ppm o menos, con mayor preferencia, de 10.000 ppm o menos, y con máxima preferencia, de 2000 ppm o menos, en donde cada una de las indicaciones de ppm se refiere a partes en peso y al peso total del homopolímero o copolímero de acrilamida sólido.

En general, el contenido de ácido acrílico de cualquier polímero o copolímero descrito en la presente se puede determinar usando métodos conocidos en el estado

de la técnica, por ejemplo, espectroscopía de RMN como se describe en European Polymer Journal (2007), 43(3): 824-834.

Los homopolímeros y/o copolímeros de acrilamida se usan, por ejemplo, en aplicaciones en yacimientos petrolíferos. En particular, se usan homopolímeros y/o copolímeros de acrilamida en la recuperación de petróleo terciaria, que también se indica como recuperación de petróleo mejorada. Con respecto a esto, en los métodos de recuperación de petróleo terciaria, se puede inyectar una solución acuosa del polímero en la roca a fin de promover el desplazamiento del petróleo y así aumentar el rendimiento del petróleo crudo. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una solución acuosa de cualquier homopolímero y/o copolímero de acrilamida descrito en la presente. Como el agua para la solución acuosa, se puede usar agua de mar.

Esta descripción incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. Esto no es un reconocimiento de que cualquiera de los datos proporcionados en la presente sea arte previo o relevante para las invenciones reivindicadas en la presente, o que cualquier publicación a la que se hace referencia de manera específica o implícita sea arte previo.

Cabe destacar que, como se usan en la presente, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de los diferentes reactivos, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por las personas del oficio de nivel medio que se podrían modificar o que podrían sustituir los métodos descritos en la presente.

Las personas del oficio de nivel medio reconocerán, o podrán determinar, usando no más que experimentos de rutina, muchos equivalentes de las formas de realización específicas de la invención que se describen en la presente. La presente invención abarca tales equivalentes.

A menos que se indique lo contrario, la expresión "al menos" antes de una serie de elementos se refiere a todos los elementos en la serie. Las personas del oficio de nivel medio reconocerán, o podrán determinar, usando no más que experimentos de rutina, muchos equivalentes de las formas de realización específicas de los métodos y usos que se describen en la presente. La presente invención abarca tales equivalentes.

Se citan varios documentos a lo largo del texto de la presente descripción. Cada uno de los documentos citados en la presente (que incluyen todas las patentes,

solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sea más arriba o más abajo, se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En la medida en que el material incorporado por referencia contradiga o sea inconsistente con la presente memoria descriptiva, la memoria descriptiva reemplazará cualquier material. Nada en la presente se debe interpretar como un reconocimiento de que la invención no puede anteceder dicha descripción en virtud de la invención anterior.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto indique lo contrario, la palabra "comprenden" y sus variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implicarán la inclusión de un entero o etapa o grupo de enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro entero o etapa o grupo de enteros o etapas. Cuando se usa en la presente, la expresión "que comprende" se puede sustituir con la expresión "que contiene" o, en ocasiones, cuando se usa en la presente con la expresión "que tiene".

Cuando se usa en la presente, la expresión "consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se usa en la presente, la expresión "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afectan considerablemente las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada caso de la presente, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede reemplazar por cualquiera de las otras dos expresiones.

Como se usa en la presente, el término de conjunción "y/o" entre múltiples elementos mencionados abarca tanto las opciones individuales como las combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos se unen mediante "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y segundo elementos juntos. Cualquiera de estas opciones se incluye en el significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en la presente. La aplicabilidad concurrente de más de una de las opciones también se incluye en el significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en la presente.

Como se usa en la presente, la expresión "alrededor de" se refiere a un valor que se encuentra dentro de un margen de error aceptable para el valor particular según lo determina una persona del oficio de nivel medio, que dependerá, en parte, de cómo se mide o se determina el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de

medición. Por ejemplo, “alrededor de” puede significar dentro de 1 o más de 1 de desviación estándar, de acuerdo con la práctica en el estado de la técnica. La expresión “alrededor de” también se usa para indicar que la cantidad o el valor en cuestión puede ser el valor designado o algún otro valor que sea aproximadamente el mismo. La frase sugiere que los valores similares promueven resultados o efectos equivalentes de acuerdo con la invención. En este contexto, la expresión “alrededor de” se puede referir a un rango por encima y/o por debajo de hasta 10 %. En algunas formas de realización, la expresión “alrededor de” se refiere a un rango por encima y por debajo de un valor determinado que es de hasta 5 %, tal como hasta 2 %, hasta 1 % o hasta 0,5 % por encima o por debajo de ese valor. En una forma de realización, la expresión “alrededor de” se refiere a un rango de hasta 0,1 % por encima y por debajo de un valor determinado.

En general, la presente invención se refiere a todas las formas de realización descritas en la presente, así como a todas las modificaciones y combinaciones de estas. Cualquier aspecto o forma de realización particular descrito en la presente no se debe interpretar como limitativo del alcance de la presente invención en tales aspectos o formas de realización.

Los siguientes ejemplos también describen y ejemplifican la invención proporcionada en la presente sin limitar la invención a cualquier memoria descriptiva o forma de realización allí definida.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

En un proceso por semilotes, se colocaron acrilonitrilo y 2446 g de agua en un reactor de vidrio, en donde el acrilonitrilo se agregó en cada ejecución de modo que se alcanzara una concentración de acrilonitrilo en el reactor como se indica más adelante en la Tabla 1. Luego se agregó el biocatalizador seco *Rhodococcus rhodochrous*, cepa NCIMB 41164, para iniciar la bioconversión. Durante la bioconversión, se agregó más acrilonitrilo a una velocidad controlada mientras que el contenido de acrilonitrilo se mantenía constantemente en el valor inicial descrito en la Tabla 1. Con respecto a esto, el contenido de acrilonitrilo y acrilamida se midió en línea durante la bioconversión usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). En total, 1553 g de acrilonitrilo, que es la cantidad total de acrilonitrilo colocada en el reactor antes de iniciar la bioconversión y agregada durante la reacción, se convirtieron en acrilamida. Al final de la reacción, se obtuvieron 4 kg de una solución acuosa de acrilamida con un contenido de 52 % p/p de acrilamida en función del peso

total de la composición en el reactor.

La siguiente Tabla 1 muestra distintas ejecuciones del método descrito en el párrafo anterior a temperaturas de 20 °C y 26 °C, respectivamente, en donde se usaron distintas cantidades de biocatalizador y el contenido de acrilonitrilo se mantuvo en diferentes valores durante la bioconversión.

Tabla 1

Ejecución	Temperatura [°C]	Cantidad de biocatalizador [g]	Contenido de acrilonitrilo mantenido durante la bioconversión [% p/p]*	Finalización de la bioconversión [h]	Concentración de ácido acrílico al final de la bioconversión [ppm]**
1	20	1,3	0,5	6,7	287
2			2	6,4	130
3		1,47	0,5	4,9	246
4			5	10,2	44
5		1,84	0,5	5	202
6			2	3,8	154
7			2,75	2,8	80
8		2,21	0,5	3,2	111
9			5	2,7	59
10	26	1,3	0,5	4,7	297
11			2	5,1	206
12		1,84	0,5	3,3	308
13			2	2,5	164
14			2,75	2,2	68
15				2,2	74
16				2,3	69

* medido en línea durante la bioconversión usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

** determinada usando HPLC de acuerdo con el método proporcionado más adelante

Los resultados indicados en la Tabla 1 muestran que, al mantener el contenido de acrilonitrilo durante la bioconversión a 0,3 % p/p o más, se producen soluciones acuosas de acrilamida que tienen bajas concentraciones de ácido acrílico. En particular, los resultados indican que, al aumentar el contenido de acrilonitrilo, que se mantiene durante la bioconversión, se reduce la concentración de ácido acrílico en las soluciones acuosas de acrilamida obtenidas.

Ejemplo 2:

Las ejecuciones de la bioconversión de acrilonitrilo en acrilamida se realizaron en las mismas condiciones que el Ejemplo 1, excepto que:

- (i) se mantuvo un mayor contenido de acrilonitrilo desde el comienzo de la

bioconversión durante 1 hora;

(ii) después de 1 hora desde el comienzo de la bioconversión, el contenido de acrilonitrilo se redujo a un menor contenido de acrilonitrilo; y

(iii) el menor contenido de acrilonitrilo se mantuvo hasta el final de la bioconversión, es decir, hasta la conversión de 1553 g de acrilonitrilo, para formar 4 kg de una solución acuosa de acrilamida con un contenido de 52 % p/p de acrilamida en función del peso total de la composición en el reactor.

Las condiciones específicas y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Ejecución	Temperatura [°C]	Cantidad de biocatalizador [g]	Contenido de acrilonitrilo mantenido durante la bioconversión [% p/p]*	Finalización de la bioconversión [h]	Concentración de ácido acrílico al final de la bioconversión [ppm]**
1	26	0,91	0,8 (mantenido durante todo el tiempo de la bioconversión)	5,73	482
2			1,5 (mantenido durante 1 hora desde el comienzo de la bioconversión), luego 0,8 (mantenido hasta el final de la bioconversión)	5,94	273
3			2 (mantenido durante 1 hora desde el comienzo de la bioconversión), luego 0,8 (mantenido hasta el final de la bioconversión)	5,79	202

* medido en línea durante la bioconversión usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

** determinada usando HPLC de acuerdo con el método proporcionado más adelante

En la ejecución 1 de la Tabla 2, el contenido de acrilonitrilo se mantuvo a 0,8 % p/p durante toda la bioconversión. En las ejecuciones 2 y 3, se mantuvo un mayor contenido de 1,5 y 2 % p/p de acrilonitrilo, respectivamente, hasta una hora a partir del comienzo de la bioconversión. Después de una hora, el contenido de acrilonitrilo se redujo a 0,8 % p/p y se mantuvo en este valor hasta el final de la bioconversión.

Los resultados muestran que, en momentos comparables necesarios hasta el final de la bioconversión, la concentración de ácido acrílico en las soluciones acuosas de acrilamida obtenidas se reduce aún más en caso de que se mantenga un mayor

contenido de acrilonitrilo durante un determinado período, entonces el contenido de acrilonitrilo se reduce a un menor contenido de acrilonitrilo, y este menor contenido de acrilonitrilo se mantiene hasta el final de la bioconversión.

Ejemplo 3:

Se colocaron agua y 18 g de acrilonitrilo en un reactor. La cantidad de agua se ajustó de modo que la cantidad total de agua y biocatalizador fuese 1835 g. Se usaron dos formas (i) y (ii) diferentes de un biocatalizador en ejecuciones independientes como se indica a continuación:

(i) un caldo de fermentación que contenía células de *Rhodococcus rhodochrous*, cepa J1 (FERM-BP 1478), con una actividad de NHasa de 1512 kU/kg y un contenido de agua de 96,1 % p/p; y

(ii) un polvo seco obtenido por concentración de (i) mediante centrifugación hasta alcanzar un contenido de agua de 83,6 % p/p y luego liofilización del concentrado. El contenido de agua del polvo seco era de 13 % p/p, y la actividad de NHasa era de 211 kU/g.

El biocatalizador se agregó al reactor, en donde se inició la reacción. Durante la bioconversión, se agregaron 1147 g adicionales de acrilonitrilo, de modo que el tamaño de lote total de la reacción al final fuese de 3000 g. La temperatura se mantuvo constante a 23 °C durante la reacción. El contenido de acrilonitrilo se midió en línea durante la bioconversión usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), y la velocidad de adición de acrilonitrilo se ajustó de modo que el contenido de acrilonitrilo en la mezcla de reacción se mantuviera constante a $1,0 \pm 0,1$ % p/p o 0,3 % p/p hasta que se agregara el total de acrilonitrilo al reactor. La reacción se detuvo una vez que el contenido de acrilonitrilo había disminuido hasta < 100 ppm debido a la conversión. Al final de la reacción, la concentración de acrilamida en cada ejecución era ≥ 51 % p/p.

Las condiciones y los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Ejecución	Forma de biocatalizador	Cantidad de biocatalizador [g]	Contenido de acrilonitrilo mantenido durante la bioconversión [% p/p]*	Tiempo de reacción [h]	Concentración de ácido acrílico al final de la bioconversión [ppm]**
1	Caldo de fermentación (i)	143	0,3	7,5	885

2	Caldo de fermentación (i)	143	1	5,7	604
3	Polvo liofilizado (ii)	0,92	0,3	6,6	568
4	Polvo liofilizado (ii)	0,92	1	5,0	305

* medido en línea durante la bioconversión usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

** determinada usando HPLC de acuerdo con el método proporcionado más adelante

Los resultados de la Tabla 3 muestran que, usando un biocatalizador seco en una bioconversión en la que el contenido de acrilonitrilo se mantiene constante, la concentración de ácido acrílico en las soluciones acuosas de acrilamida obtenidas se reduce en comparación con el uso de un biocatalizador que no se sometió a secado.

En los ejemplos mencionados anteriormente, la concentración de ácido acrílico en las soluciones acuosas de acrilamida obtenidas se determinó usando HPLC. Se aplicaron las siguientes condiciones a fin de determinar los contenidos de acrilamida, ácido acrílico y acrilonitrilo:

Columna: Aqua C18, 250*4,6 mm (Phenomenex)
 Precolumna: C18 Aqua
 Temperatura: 40 °C
 Velocidad de flujo: 1,00 ml/min
 Volumen de inyección: 1,0 µl
 Detección: Detector UV, longitud de onda de 210 nm
 Tiempo de detención: 8,0 minutos
 Tiempo posterior: 0,0 minutos
 Presión máxima: 250 bar
 Eluyente A: 10 mM de KH₂PO₄, pH 2,5
 Eluyente B: Acetonitrilo
 Gradiente:

Tiempo [min]	A [%]	B [%]	Flujo [ml/min]
0,0	90,0	10,0	1,00
8,0	90,0	10,0	1,00

Matriz: Caldos de fermentación, mezclas de bioconversión
 La muestra se filtró a través de 0,22 µm

Analitos:

	Tiempo de retención [min]
Acrilamida	3,29
Ácido acrílico	3,91
Acrilonitrilo	4,35