

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390239** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2023.09.08(22) Дата подачи заявки
2023.02.02(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2023.01)
C12N 9/88 (2023.01)
C12P 13/02 (2023.01)
B01J 37/36 (2023.01)
C12R 1/01 (2023.01)

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ Rhodococcus aetherivorans ВКПМ Ас-2208 - ПРОДУЦЕНТ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ КЛЕТОК ШТАММА Rhodococcus aetherivorans ВКПМ Ас-2208 И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АКРИЛАМИДА

(96) 2023000016 (RU) 2023.02.02
(71) Заявитель:
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"БИОАМИД" (RU)

(72) Изобретатель:
Воронин Сергей Петрович, Семенов
Владимир Сергеевич, Сингирицев
Игорь Николаевич, Синолицкий
Максим Константинович, Синтин
Андрей Анатольевич, Лавров
Константин Валерьевич, Новиков
Андрей Дмитриевич, Яненко
Александр Степанович (RU)

(74) Представитель:
Романова Н.В. (RU)

(57) Группа изобретений относится к биотехнологии и микробиологической промышленности и касается нового штамма бактерий *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 с высокой активностью фермента нитрилгидратазы, биокатализатора на основе клеток данного штамма для получения акриламида и способа получения растворов акриламида с использованием биокатализатора. Технической проблемой является разработка более эффективного промышленного биокатализатора на основе нового штамма бактерий *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы, который позволил бы получать высококонцентрированные растворы акриламида (до 650 г/л (62,1%)) при более высоких температурах и концентрациях акрилонитрила в процессе синтеза. Для решения поставленной проблемы был выделен штамм-продуцент нитрилгидратазы *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 с высоким уровнем термостабильности и устойчивости к акрилонитрилу. Разработан способ получения биокатализатора на основе биомассы клеток штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы, заключающийся в добавлении к культуральной жидкости, содержащей биомассу штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208, коагулянта на основе полидиаллилдиметиламмония хлорида в количестве от 0,1 до 1%, отделении биомассы от жидкости, промывании водой, добавлении при перемешивании сульфата натрия или аммония в количестве 5-20% от веса биомассы до получения однородной суспензии биокатализатора. Разработан способ получения акриламида с использованием биокатализатора, полученного из биомассы клеток штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы, заключающийся во внесении суспензии биокатализатора в воду при поддержании pH реакционной смеси 7,0-8,5, непрерывном добавлении в реакционную смесь акрилонитрила с переменной скоростью во времени, отделении биокатализатора от реакционной смеси с получением раствора акриламида 40-60% концентрации. Температуру реакции поддерживают от 18 до 27°C.

A1**202390239****202390239****A1**

ШТАММ БАКТЕРИЙ *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 – ПРОДУЦЕНТ
НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ
КЛЕТОК ШТАММА *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 И СПОСОБ
ПОЛУЧЕНИЯ АКРИЛАМИДА

Группа изобретений относится к биотехнологии и микробиологической промышленности и касается нового штамма бактерий *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 с высокой активностью фермента нитрилгидратазы, биокатализатора на основе клеток данного штамма для получения акриламида и способа получения растворов акриламида с использованием биокатализатора.

Акриламид широко используется в промышленном производстве различных гидрофильных полимеров и сополимеров. Биотехнологический способ получения акриламида на сегодняшний день является наиболее эффективным, экологичным и перспективным для крупнотоннажного производства, так как позволяет получать растворы акриламида в мягких условиях, при температурах от 5 до 30°C, при атмосферном давлении, без необходимости их дальнейшего концентрирования, а также без образования токсичных отходов.

Известно множество природных штаммов микроорганизмов, относящихся к различным таксономическим группам, способных продуцировать нитрилгидратазу. Несмотря на достижения в области селекции и модификации штаммов-продуцентов нитрилгидратазы, сохраняется потребность промышленности в новых биокатализаторах. Это связано с расширением мирового спроса на полимеры акриламида и с высокой стоимостью запатентованных технологий.

Известен способ получения акриламида (см. патент РФ № 2077588 по кл. МПК C12P 13/02, опуб. 20.04.1997), заключающийся в проведении гидратации акрилонитрила с использованием в качестве биокатализатора биомассы штамма *Rhodococcus rhodochrous* М33 ВКПМ 1268, обладающей нитрилгидратазной активностью, с последующим выделением целевого продукта, при этом гидратацию проводят при исходной концентрации акрилонитрила не более 0,1% и поддерживают ее на этом уровне в течение всего процесса. Способ позволяет получать концентрированные растворы акриламида с концентрацией до 600 г/л.

Недостатком данного способа является необходимость тщательного контроля за концентрацией акрилонитрила и поддержание очень низкой концентрации его в реакционной среде (не более 0,1%). При увеличении концентрации акрилонитрила выход акриламида снижается. Температура синтеза акриламида не превышает 22°C, что снижает

эффективность процесса. Кроме того, биокатализатор не позволяет получать растворы с концентрацией выше 600 г/л акриламида.

Известен штамм *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164 и его применение в качестве продуцента нитрилгидратазы (см. патент РФ №2403280 по кл. МПК C12N1/20, опуб. 10.11.2010). Способ получения амида из соответствующего нитрила заключается в том, что нитрил подвергают реакции гидратации в водной среде в присутствии биокатализатора, которым является штамм микроорганизма *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 41164, а амид представляет собой (мет)акриламид. При этом, биокатализатор вносят в водную среду и (мет)акрилонитрил добавляют в водную среду таким образом, чтобы концентрация (мет)акрилонитрила в водной среде поддерживалась на уровне, составляющем вплоть до 6 мас.%. Реакцию продолжают до достижения концентрацией акриламида уровня от 30 до 55 мас.%.

Недостатком данного способа является необходимость дополнительной инкубации клеток штамма перед использованием и штамм-продуцент нитрилгидратазы имеет низкую скорость роста.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является штамм бактерий *Rhodococcus aetherivorans* ВКМ Ас-2610D - продуцента нитрилгидратазы и способ получения акриламида с использованием биомассы клеток данного штамма (см. патент РФ № 2520870 по кл. МПК C12N1/20, опуб. 27.06.2014), заключающийся в том, что гидратацию проводят при рабочей концентрации акрилонитрила, не превышающей 0,5%, с использованием биомассы штамма бактерий *Rhodococcus aetherivorans* ВКМ Ас-2610D из расчета порядка 400-500 г по сухой массе штамма на 1 тонну конечного продукта - акриламида с концентрацией 45-49%. Гидратацию акрилонитрила проводят при температуре 10-23°C и pH 6.8-8.4.

Недостатком этого решения является невозможность получения растворов акриламида выше 49% из-за необратимой инактивации нитрилгидратазы в концентрированных растворах акриламида, а также низкая термостабильность фермента, не позволяющая проводить синтез выше 23°C.

Проблемой, на которую направлено данное изобретение, является разработка более эффективного промышленного биокатализатора на основе нового штамма бактерий *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы, который позволил бы получать высококонцентрированные растворы акриламида (до 650 г/л (62,1%)) при более высоких температурах и концентрациях акрилонитрила в процессе синтеза.

Техническим результатом является увеличение эффективности и упрощение процесса получения концентрированных растворов акриламида за счет разработки биокатализатора на основе клеток нового штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы.

Для достижения заявляемого результата и решения поставленной проблемы был выделен штамм-продуцент нитрилгидратазы *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 с высоким уровнем термостабильности и устойчивости к акрилонитрилу. Разработан способ получения биокатализатора на основе биомассы клеток штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы, а также разработан способ получения акриламида с использованием указанного биокатализатора.

Согласно заявляемому решению, способ получения биокатализатора на основе биомассы клеток штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы заключается в добавлении к культуральной жидкости, содержащей биомассу штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 коагулянта на основе полидиаллилдиметиламмония хлорида в количестве от 0,1 до 1%, отделении биомассы от жидкости, промывании водой, добавлении при перемешивании сульфата натрия или аммония в количестве 5-20% от веса биомассы до получения однородной суспензии биокатализатора. Коагулянт на основе полидиаллилдиметиламмония хлорида преимущественно добавляют в количестве от 0,2 до 0,7%.

Согласно заявляемому решению, способ получения акриламида с использованием биокатализатора, полученного из биомассы клеток штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы, заключается во внесении суспензии биокатализатора в воду при поддержании рН реакционной смеси 7,0-8,5, непрерывном добавлении в реакционную смесь акрилонитрила с переменной скоростью во времени, отделении биокатализатора от реакционной смеси с получением раствора акриламида 40 - 60% концентрации. Температуру реакции поддерживают от 18 до 27°C.

Штамм *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 был выделен из почвы производства акриламида и полимеров акриламида. Штамм характеризуется следующими морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

Морфологические свойства: грамположительный штамм с жизненным циклом родококков, неподвижный, спор и капсул не образует, не кислотоустойчив, облигатный аэроб.

Биохимические свойства: восстанавливает нитраты до нитритов. Образует сероводород. Реакция Фогес-Проскауэра и тест с метиловым красным отрицательные. Штамм оксидазаотрицательный, каталаза и фосфатазаположительный. Не гидролизует крахмал и целлюлозу. Гидролизует твин-60 и твин-80. Штамм растет при pH 6-9, температуре 5-45⁰ С. Образует кислоту без газообразования из следующих сахаров и спиртов: глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, сорбита, маннита и глицерина. В качестве единственного источника азота использует соединения аммония, нитраты и мочевины. В качестве единственного источника углерода использует мальтозу, манит, глюкозу, сорбит, глицерин, лактат, пируват, бензоат, п- и м-гидроксибензоат, тирозин; не использует рамнозу, галактозу, инозит, 2-оксоглутарат.

Культуральные свойства:

В возрасте 18-20 ч клетки образуют слабоветвящиеся нити, которые через 48-72 ч распадаются на палочковидные и кокковидные элементы. На плотных питательных средах (МПА, Хоттингер,) через 48 ч роста штамм образует круглые гладкие колонии диаметром 1-2 мм, окрашенные от палево-розового до розово-оранжевого цвета. При росте на мясо-пептонном бульоне образуются пленка и осадок. Лакмусовое молоко не изменяется.

Патогенность: штамм непатогенный.

В клеточной стенке штамма обнаружены мезо-диаминопимелиновая кислота, арабиноза и галактоза, липид LCN-A характерный для родококков.

На основании перечисленных выше свойств, а также данных анализа 16S рибосомальной рибонуклеиновой кислоты, штамм был отнесен к роду *Rhodococcus* виду *aetherivorans*.

Штамм был депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов под номером Ас-2208 (справка о депонировании Биоресурсного Центра – Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» № 2208).

Клетки штамма хорошо растут на жидких минеральных средах, содержащих фосфаты, соли магния, железа. В качестве источников углерода используются глюкоза, ацетат. Для синтеза нитрилгидратазы требуется введение солей кобальта и мочевины. Мочевина также является источником азота. Штамм обеспечивает высокий уровень нитрилгидратазной активности до 350 Ед/мг сухих клеток.

Для отделения биомассы клеток от культурального бульона широко применяются полиэлектролиты (см. патент RU 2266954). Их использование позволяет отделять биомассу клеток, хорошо отмывать ее от культуральной жидкости и обезвоживать простыми доступными промышленными методами, без использования сложного

дорогостоящего оборудования типа высокоскоростных проточных центрифуг, например фильтрацией.

Было найдено, что эффективным коагулянтом для клеток *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 является гомополимер полидиаллилдиметиламмония хлорид в количестве от 0,1 до 1,0% от объема культуральной жидкости при температуре от 15 до 35°C. Обработанные клетки легко отделяются от жидкости на рамных фильтр-прессах, промываются водой и обезвоживаются. При внесении меньшего количества коагулянта происходит неполная коагуляция и в процессе фильтрации образуется мутный фильтрат и снижение скорости фильтрации. При добавлении большего, чем 1,0%, количества полидиаллилдиметиламмония хлорида наблюдается ухудшение фильтруемости суспензии и плохое отделение осадка от фильтровальной ткани.

Однако при использовании флокулированной биомассы возникает проблема при ее повторном разведении для процесса получения акриламида. Для ее ресуспендирования требуется специальное оборудование типа гомогенизаторов или бисерных мельниц (патент RU 2159817). Без интенсивной гомогенизации существенно снижается эффективность получения акриламида и увеличивается расход биокатализатора.

Неожиданно оказалось, что добавление солей, например сульфата аммония или сульфата натрия в количестве от 5 до 20% от веса влажной биомассы позволяет легко готовить однородную суспензию биокатализатора для эффективного синтеза с помощью механической мешалки. Исследованиями было определено, что для приготовления однородной суспензии соотношение смеси биомассы и соли с водой на начальном этапе приготовления должно быть в диапазоне от 1:1,5 до 1:3, при большем количестве воды суспензия сохраняет неоднородность.

Биокатализатор готовят при температуре от 5 до 25°C, преимущественно 15-25°C. Приготовление производят в лопастном смесителе, прибавляя постепенно кристаллическую соль при перемешивании биомассы в количестве от 5 до 20 % от веса влажной биомассы, преимущественно от 8 до 12%. При добавлении меньшего, чем 5-8% количества соли, не происходит образования однородной смеси, сохраняется зернистость и при приготовлении рабочих суспензий наблюдаются крупинки биокатализатора. Расход такого биокатализатора по сравнению с однородным существенно выше. Добавление же более 10-20% соли не влияет на однородность получаемого биокатализатора, но снижает активность за счет разбавления.

Данная форма биокатализатора позволяет по окончании синтеза акриламида отделять отработанный биокатализатор от раствора акриламида методом фильтрации. Осадок промывается водой, которая вновь направляется в синтез акриламида.

Способ получения акриламида проводят следующим образом.

Биокатализатор, полученный как описано выше, готовят отдельно, смешивая с водой в соотношении 1:2 в аппарате с мешалкой в течение 45 мин. Затем добавляют еще 8 частей воды и продолжают перемешивание еще 15 минут.

В зависимости от необходимого времени синтеза и конечной концентрации акриламида опытным путем определяется минимальная доза биокатализатора для проведения синтеза. Для 4 или 6 часового синтеза в реактор с мешалкой и рубашкой заливают расчетное количество воды с температурой 25°C и добавляют необходимое количество суспензии биокатализатора, рН раствора должен быть 7,7-8,3. При значениях рН меньших, чем 7,7 или больших, чем 8,3 наблюдается снижение скорости синтеза и увеличение расхода биокатализатора. При выходе за диапазон рН менее 7,0 и более 9,0 получить концентрированные растворы акриламида не удается.

В реактор при перемешивании начинают непрерывно добавлять акрилонитрил с переменной скоростью, обеспечивающей, для 4-х часового синтеза, подачу за первый час 53% от расчетного количества акрилонитрила на синтез, за второй час 26%, за третий час 15% и за 4-й час – 6% от общего расчетного количества акрилонитрила на синтез. Для 6-и часового синтеза, соответственно ведут подачу акрилонитрила за первый час 33% от расчетного количества акрилонитрила на синтез, за второй час – 26%, за третий час – 18%, за 4-й час – 11%, за 5-й час – 7% и за 6-й час – 5%. Температуру реакционного раствора поддерживают около 25°C. Через 30 минут после окончания дозирования акрилонитрила синтез завершен. Акрилонитрил в реакционном растворе анализируют методом ГЖХ, акриламид методом ВЭЖХ УФ-спектрофотометрией или рефрактометрией. Анализ осуществляют один раз в час. По окончании процесса биокатализатор отделяют от реакционной массы методом фильтрации. В результате процесса получают растворы с концентрацией акриламида от 40 до 60%.

Следует отметить, что биокатализатор на основе нового штамма устойчив к действию акрилонитрила. Это позволяет проводить синтез акриламида, не опасаясь увеличения концентрации акрилонитрила до 8%. В примерах 3 и 5 показано, что при проведении синтезов с одинаковым количеством биокатализатора при более быстрой дозации (за 2 часа) акрилонитрила с дальнейшим выдерживанием раствора при постоянной температуре к расчетному времени синтез завершается также, как и при

непрерывной более медленной дозации акрилонитрила (за 4 часа). Это упрощает процесс получения акриламида. Данный биокатализатор является более термостабильным, чем биокатализатор по прототипу, так как позволяет проводить синтеза акриламида при температурах до 25-27°C. Это очень важно, поскольку гидролиз акриламида – это экзотермический процесс, при котором необходимо интенсивное отведение тепла. Устойчивость биокатализатора к временным повышениям температуры делает весь процесс синтеза акриламида более устойчивым. Повышение температуры синтеза до 29°C и более приводит к постепенной инактивации нитрилгидратазы и накоплению непрореагировавшего акрилонитрила в реакционной смеси в конце синтеза. При этом расход биокатализатора ниже при проведении синтезов при 25-27°C по сравнению с 17°C, что представлено в примерах ниже.

Определение нитрилгидратазной активности проводят следующим образом: в 0.01 М фосфатном буфере, рН 7.6, готовили суспензию клеток с концентрацией 0.03-0.06 мг сухих клеток в 1мл. К 1 мл суспензии добавляют 25 мкл акрилонитрила. Реакцию проводят в термошейкере при температуре 25°C при встряхивании с частотой 1000 мин-1 в течение 10 мин. Реакцию останавливают добавлением 50 мкл 20% хлористоводородной кислоты. Бактериальные клетки отделяют центрифугированием. Концентрацию акриламида в надосадочной жидкости определяют спектрофотометрическим методом.

За единицу нитрилгидратазной активности (ед/мг) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ акриламида за одну минуту, содержащееся в 1 мг сухих клеток. За единицу общей нитрилгидратазной активности (ед/мл) принимали количество единиц фермента, содержащееся в 1 мл культуральной жидкости.

Пример1. Культивирование штамма бактерий *Rhodococcus aetheriovorans* ВКПМ Ас-2208 в промышленных условиях.

Промышленный ферментёр объёмом 1,5 м³, содержащий 1 м³ среды следующего состава (г/л): НЗРО₄ (100%) - 3,45; КОН - 0,7; NaOH - 2,0; FeSO₄-7H₂O - 0,1; ЭДТА Na - 0,2; СоСl₂-6H₂O - 0,06; MgSO₄-7H₂O - 1,0; мочевины - 16,0; глюкоза - 40,0; аспарагиновая кислота - 2,0, засеивали 35 л инокулята. Ферментацию проводили при 28 - 30°C и аэрации 0,5 мин-1. На 26 ч роста в аппарат вводили ещё 20,0 г/л глюкозы. Когда глюкоза в среде закончилась, в аппарат внесли 4 г/л ацетата натрия и в дальнейшем поддерживали рН на уровне 7,8 50% водным раствором уксусной кислоты. Через 72 ч культивирования было получено 24,0 г/л сухих клеток с

нитрилгидратазной активностью 350 Ед/мг. Общая нитрилгидратазная активность составила 8400 Ед/мл.

Пример 2. Флокуляция клеток и приготовление биокатализатора.

К культуральной жидкости после ферментации из примера 1 при перемешивании добавляли раствор полимера полидиаллилдиметиламмония хлорида, (например, полиэлектролит катионный ВПК-402 производства АО БСК, Стерлитамак) в количестве 0,5% по товарному весу. В процессе обработки происходит флокуляция клеток штамма. Полученную суспензию направляли для фильтрации на рамный фильтр-пресс, на котором происходило отделение биомассы от жидкости. Биомассу промывали водой, отжимали сжатым воздухом и выгружали в промежуточный сборник. Биомассу взвешивали. 100 г биомассы без добавления соли убирали в пластиковый контейнер и замораживали при -18°C для сравнительного примера. Остальную биомассу переносили в лопастной смеситель и при перемешивании добавляли сульфат натрия или аммония в виде безводных солей в количестве 10% от веса биомассы. Смешивание продолжали до однородного состояния, полученную пасту помещали в полиэтиленовые емкости с крышками, замораживали при -18°C и хранили для последующего использования. Удельная активность биокатализатора составила 330 Ед./ мг. Содержание сухих веществ 37,1%.

Пример 3. Получение раствора акриламида с использованием биокатализатора.

2,0 г биокатализатора, полученного по примеру 2 помещали в фарфоровый стакан вместимостью 50 мл и добавляли 4,0 г обессоленной воды. Смесь перемешивали с помощью пропеллерной мешалки сначала при частоте вращения 300-500 мин⁻¹ в течение 3-5 мин, а затем при 2000 мин⁻¹ в течении 40 минут. Затем к смеси добавляли еще 14,0 г обессоленной воды и перемешивали еще 15 минут. Полученная суспензия биокатализатора была однородной и подвижной.

Синтез проводили в реакторе из нержавеющей стали объемом 3,4 литра с механической мешалкой, рубашкой и трубчатым змеевиком из нержавеющей стали внутри реактора для более эффективного отвода тепла. В рубашку и змеевик подавали воду с температурой 25°C из охлаждаемого термостата. В реактор вносили 1400 г обессоленной воды, приготовленную суспензию биокатализатора, стакан промывали обессоленной водой в количестве 80 г, выливая порции промывной воды в реактор. После достижения температуры реакционной смеси 25°C начинали подачу 905 г акрилонитрила насосом по программе: 1 час- 479,1 г, 2 час -239,6 г, 3 час – 133,1 г, 4 час – 53,2 г. Акриламид и акрилонитрил в растворе анализировали методом газовой хроматографии с периодичностью один раз в час. Через 1 час обнаруживали 3,3%

акрилонитрила, через 2 часа – 2,0%, через 3 часа – 1,4%, через 4 часа – 0,4%. Через 30 минут после завершения дозирования акрилонитрила в реакционном растворе обнаруживали 0,01% акрилонитрила и не обнаруживали акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 50,4%.

Пример 4. Сравнительный. Получение раствора акриламида с помощью биокатализатора без добавления сульфата натрия или сульфата аммония.

2,0 г биокатализатора, полученного по примеру 2, но без добавления соли, помещали в фарфоровый стакан вместимостью 50 мл и добавляли 4,0 г обессоленной воды. Смесь перемешивали с помощью пропеллерной мешалки сначала при частоте вращения 300-500 мин⁻¹ в течение 3-5 мин, а затем при 2000 мин⁻¹ в течении 40 минут. Затем к смеси добавляли еще 14,0 г обессоленной воды и перемешивали еще 15 минут. В полученной суспензии биокатализатора наблюдали различные по величине кусочки биомассы.

Синтез проводили в реакторе из нержавеющей стали объемом 3,4 литра с механической мешалкой, рубашкой и трубчатым змеевиком из нержавеющей стали внутри реактора для более эффективного отвода тепла. В рубашку и змеевик подавали воду с температурой 25°C из охлаждаемого термостата. В реактор вносили 1400 г обессоленной воды, приготовленную суспензию биокатализатора, стакан промывали обессоленной водой в количестве 80 г, выливая порции промывной воды в реактор. После достижения температуры реакционной смеси 25°C начинали подачу 905 г акрилонитрила насосом по программе: 1 час- 479,1 г, 2 час -239,6 г, 3 час – 133,1 г, 4 час – 53,2 г. Акриламид и акрилонитрил в растворе анализировали методом газовой хроматографии с периодичностью один раз в час. Через 30 минут после завершения дозирования акрилонитрила в реакционном растворе наблюдали органическую фазу непрореагировавшего акрилонитрила. Концентрация акриламида в водной фазе составляла 35,2%.

Пример 5. Получение раствора акриламида с использованием биокатализатора с быстрой дозацией акрилонитрила.

2,0 г биокатализатора, подготавливали аналогично примеру 3.

Синтез проводили в реакторе из нержавеющей стали объемом 3,4 литра с механической мешалкой, рубашкой и трубчатым змеевиком из нержавеющей стали внутри реактора для более эффективного отвода тепла. В рубашку и змеевик подавали воду с температурой 25°C из охлаждаемого термостата. В реактор вносили 1400 г обессоленной воды, приготовленную суспензию биокатализатора, стакан промывали

обессоленной водой в количестве 82 г, выливая порции промывной воды в реактор. После достижения температуры реакционной смеси 25°C начинали подачу 905 г акрилонитрила насосом по программе: 1 час- 638,8 г, 2 час -266,2 г. Далее продолжали инкубацию реакционного раствора без дозирования акрилонитрила. Акриламид и акрилонитрил в растворе анализировали методом газовой хроматографии с периодичностью один раз в час. Через 1 час обнаруживали 8,0% акрилонитрила, через 2 часа – 7,7% , через 3 часа – 2,6%, через 4 часа – 0,25%. Через 4 часа 30 минут от начала синтеза в реакционном растворе обнаруживали 0,03% акрилонитрила и не обнаруживали акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 50,4%.

Пример 6. Получение высококонцентрированного раствора акриламида.

7,0 г биокатализатора, полученного по примеру 2 помещали в фарфоровый стакан вместимостью 150 мл и добавляли 14,0 г обессоленной воды. Смесь перемешивали с помощью пропеллерной мешалки сначала при частоте вращения 300-500 мин-1 в течение 3-5 мин, а затем при 2000 мин-1 в течении 40 минут. Затем к смеси добавляли еще 49,0 г обессоленной воды и перемешивали еще 15 минут.

Синтез проводили в реакторе из нержавеющей стали объемом 3,4 литра с механической мешалкой, рубашкой и трубчатым змеевиком из нержавеющей стали внутри реактора для более эффективного отвода тепла. В рубашку и змеевик подавали воду с температурой 25°C из охлаждаемого термостата. В реактор вносили 897 г обессоленной воды, приготовленную суспензию биокатализатора, стакан промывали обессоленной водой в количестве 80 г, выливая порции промывной воды в реактор. После достижения температуры реакционной смеси 25°C начинали подачу 905 г акрилонитрила насосом по программе: 1 час- 479,1 г, 2 час -239,6 г, 3 час – 133,1 г, 4 час – 53,2 г. Акриламид и акрилонитрил в растворе анализировали методом газовой хроматографии с периодичностью один раз в час. Через 60 минут после завершения дозирования акрилонитрила в реакционном растворе не обнаруживали остаточного содержания акрилонитрила и акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 62,1% или 650 г/л при 25°C.

Пример 7. Получение раствора акриламида с концентрацией 40,4% при температуре 17°C при 6 часовой дозации акрилонитрила.

1,82 г биокатализатора с активностью 283 ед/мг и влажностью 62,9% готовили как описано в примере 3.

Синтез проводили в реакторе из нержавеющей стали объемом 3,4 литра с механической мешалкой, рубашкой и трубчатым змеевиком из нержавеющей стали внутри реактора для более эффективного отвода тепла. В рубашку и змеевик подавали воду с температурой 17°C из охлаждаемого термостата. В реактор вносили 1995 г обессоленной воды, приготовленную суспензию биокатализатора, стакан промывали обессоленной водой в количестве 80 г, выливая порции промывной воды в реактор. После достижения температуры реакционной смеси 17°C начинали подачу 905 г акрилонитрила насосом по программе: 1 час- 299 г, 2 час -235 г, 3 час – 163 г, 4 час – 100 г, 5 час- 63 г, 6-й час-45 г. Через 6 часа 30 минут от начала синтеза в реакционном растворе обнаруживали менее 0,01% акрилонитрила и не обнаруживали акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 40,4%.

Пример 8. Получение раствора акриламида с концентрацией 40,4% при температуре 27°C при 6 часовой дозации акрилонитрила.

1,45 г биокатализатора с активностью 283 ед/мг и влажностью 62,9% готовили как описано в примере 3.

Синтез проводили как в примере 7 за исключением того, что температура в термостате была 27°C. Через 6 часов 30 минут от начала синтеза в реакционном растворе обнаруживали менее 0,01% акрилонитрила и не обнаруживали акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 40,4%.

Пример 9. Получение раствора акриламида с концентрацией 40,4% при температуре 27°C при 4-х часовой дозации акрилонитрила.

1,82 г биокатализатора с активностью 283 ед/мг и влажностью 62,9% готовили как описано в примере 3.

Синтез проводили как в примере 3 за исключением того, что температура в термостате была 27°C. Через 6 часов 30 минут от начала синтеза в реакционном растворе обнаруживали менее 0,01% акрилонитрила и не обнаруживали акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 40,4%.

Пример 9. Получение раствора акриламида с концентрацией 40,4% при температуре 27°C при 4 часовой дозации акрилонитрила.

1,82 г биокатализатора с активностью 283 ед/мг и влажностью 62,9% готовили как описано в примере 3.

Синтез проводили как в примере 3 за исключением того, что в реактор вносили 1995 г обессоленной воды и температура в термостате была 27°C. Через 4 часа 30 минут от начала синтеза в реакционном растворе обнаруживали 0,01% акрилонитрила и не обнаруживали акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 40,4%.

Пример 10. Получение раствора акриламида с концентрацией 50,4% при температуре 17°C при 6 часовой дозации акрилонитрила.

2,2 г биокатализатора с активностью 283 ед/мг и влажностью 62,9% готовили как описано в примере 3.

Синтез проводили как в примере 7 за исключением того, что в реактор вносили 1400 г обессоленной воды. Через 6 часов 30 минут от начала синтеза в реакционном растворе обнаруживали 0,02% акрилонитрила и не обнаруживали акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 50,4%.

Пример 11. Получение раствора акриламида с концентрацией 50,4% при температуре 27°C при 4 часовой дозации акрилонитрила.

1,95 г биокатализатора с активностью 283 ед/мг и влажностью 62,9% готовили как описано в примере 3.

Синтез проводили как в примере 3 за исключением того, что температуру в термостате устанавливали 27°C. Через 4 часа 30 минут от начала синтеза в реакционном растворе обнаруживали 0,01% акрилонитрила и не обнаруживали акриловой кислоты. Реакционный раствор фильтровали через полипропиленовую ткань. Получали прозрачный бесцветный раствор акриламида с концентрацией 50,4%.

В таблице 1 представлены данные из примеров 7-11, которые показывают, что при 27°C расход биокатализатора на 1 кг акриламида ниже, чем при 17°C.

Таблица 1.

№ примера	Конечная концентрация акриламида	Время синтеза, ч	Температура синтеза, градусы по Цельсию	Расход биокатализатора на синтез, гр	Расход биокатализатора гр на 1 кг акриламида
7	40,4%	6	17	1,82	1,50
8	40,4%	6	27	1,45	1,20
9	40,4%	4	27	1,82	1,50

10	50,4%	4	17	2,20	1,82
11	50,4%	4	27	1,95	1,61

ФОРМУЛА ГРУППЫ ИЗОБРЕТЕНИЙ

1. Штамм *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцент нитрилгидратазы.

2. Способ получения биокатализатора на основе биомассы клеток штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы по п.1, заключающийся в добавлении к культуральной жидкости, содержащей биомассу штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208, коагулянта на основе полидиаллилдиметиламмония хлорида в количестве от 0,1 до 1%, отделении биомассы от жидкости, промывании водой, добавлении при перемешивании сульфата натрия или аммония в количестве 5-20% от веса биомассы до получения однородной суспензии биокатализатора.

3. Способ получения биокатализатора по п.2, отличающийся тем, что коагулянт на основе полидиаллилдиметиламмония хлорида добавляют в количестве от 0,2 до 0,7%,

4. Способ получения акриламида с использованием биокатализатора по п.2., полученного из биомассы клеток штамма *Rhodococcus aetherivorans* ВКПМ Ас-2208 - продуцента нитрилгидратазы, заключающийся во внесении суспензии биокатализатора в воду при поддержании рН реакционной смеси 7,0-8,5, непрерывном добавлении в реакционную смесь акрилонитрила с переменной скоростью во времени, отделении биокатализатора от реакционной смеси с получением раствора акриламида 40 - 60% концентрации

4. Способ получения акриламида по п. 4, отличающийся тем, что температуру реакции поддерживают от 18 до 27⁰ С.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202390239**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01)
B01J 37/36 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
 C12N 1/20, 9/88, C12P 13/02, B01J 37/00, 37/36, C12R 1/01

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
 Espascanet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2520870 C1 (КЕМИРА ОЮЙ) 27.06.2014, формула, примеры 1-5	1-4
A	WO 2017/199200 A1 (COLUMBIA S.R.L.) 23.11.2017, формула, примеры 1-7	1-4
A	RU 2198927 C2 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "ПЕРМСКИЙ ЗАВОД ИМ. С.М. КИРОВА") 20.02.2003, страница 4, строки 2-9, пример 4	1-4
A	RU 2212450 C2 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "ПЕРМСКИЙ ЗАВОД ИМ. С.М. КИРОВА") 20.09.2003, пример 1	1-4

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

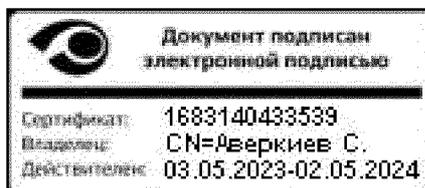
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 27 июня 2023 (27.06.2023)

Уполномоченное лицо:
 Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев