

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 874**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/GB2012/051690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13011292**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12737334 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2732022**

54 Título: **Microorganismo para convertir dióxido de carbono en ácidos carboxílicos alifáticos mediante un intermedio de ácido fórmico**

30 Prioridad:

15.07.2011 GB 201112231

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

18.06.2018

73 Titular/es:

**VERDANT BIOPRODUCTS LIMITED (100.0%)
The Pinnacle, 170 Midsummer Boulevard
Milton Keynes, MK9 1FE, GB**

72 Inventor/es:

FINNEGAN, IRENE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 874 T3

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

DESCRIPCION

Microorganismo para convertir dióxido de carbono en ácidos carboxílicos alifáticos mediante un intermedio de ácido fórmico

Campo de la invención.

- 5 La presente invención se refiere a un microorganismo capaz de convertir dióxido de carbono en ácido fórmico, que luego se convierte en ácidos carboxílicos alifáticos de longitud de cadena mayor. Sistemas enzimáticos particulares en el microorganismo son responsables de estas reacciones. Otros aspectos de la invención se refieren a métodos para producir ácido fórmico y ácidos carboxílicos alifáticos, y los propios ácidos carboxílicos alifáticos.

Antecedentes de la invención.

- 10 A lo largo de los últimos años ha aumentado la preocupación por el consumo de combustibles fósiles y la producción de gases con efecto invernadero. Una forma de reducir la dependencia mundial de los combustibles fósiles ha sido el desarrollo de biocombustibles a partir de fuentes renovables. Los biocombustibles como el biodiesel y el bioetanol se consideran alternativas más limpias y más respetuosas con el medio ambiente que los combustibles fósiles.

- 15 Aunque los biocombustibles pueden contribuir a reducir las emisiones invernadero, no carecen de problemas. Un aspecto controvertido es el problema de "alimentos por combustible", donde la demanda de cultivos energéticos se ha percibido como un aumento de los precios de los productos básicos de grano. Otro serio inconveniente es el daño causado en los ecosistemas ecológicamente sensibles, tales como las selvas tropicales, donde la siembra de cultivos energéticos como la soja y la palma ha causado una destrucción a gran escala.

- 20 La industria de los biocombustibles se está volviendo a los biocombustibles de segunda y tercera generación para aliviar estos problemas. La producción de combustibles por microorganismos (1) y el uso de sustratos de desecho (2) son áreas importantes de investigación.

- 25 Es conocida la conversión de dióxido de carbono en moléculas de combustible. El dióxido de carbono se puede convertir químicamente (3), electroquímicamente (4), y, bien sea directa (5) o indirectamente (6), mediante microorganismos. Se han señalado productos tales como ácido fórmico, formiato, metanol, formaldehído, etileno, metano y ácido oxálico. Sin embargo, estos microorganismos no pueden convertir el dióxido de carbono a través del ácido fórmico en una fuente de energía de cadena más larga, tal como ácidos carboxílicos alifáticos.

- 30 En el documento US 2012003705, se describe la conversión de dióxido de carbono en biomasa (7) y luego el posterior procesamiento de la biomasa para dar una gama de moléculas comercialmente útiles. Sin embargo, esto no se hace a través de los pasos de fijar el dióxido de carbono a ácido fórmico y convertir después el ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos.

- 35 Los intentos anteriores de usar dióxido de carbono como sustrato carbonado para producir moléculas de combustible han tenido limitaciones. El dióxido de carbono y sus iones acuosos de bicarbonato y carbonato son inherentemente estables y la energía libre de Gibbs de formación son la más electronegativa de las moléculas carbonadas. Convertir el dióxido de carbono en moléculas de combustible requiere una gran cantidad de energía (calor), unas condiciones extremas (presión), y productos químicos altamente reactivos (catalizadores). Los rendimientos suelen ser escasos y las velocidades de reacción son bajas. Los planteamiento químicos para el uso directo de dióxido de carbono no se consideran generalmente viables económicamente. Del mismo modo, la producción inicial de biomasa por bacterias quimiolitotróficas no se practica ampliamente debido a los imperativos del costo del crecimiento y del posterior procesamiento.

- 40 La electrocatálisis ha tenido también un éxito limitado. Los resultados se han visto limitados por la escasa solubilidad del dióxido de carbono en el agua (0,033 M) y los requerimientos energéticos de una reacción con un fuerte potencial electronegativo ($E_0 = -0,61$ V). La electrocatálisis es también una tecnología costosa que requiere metales de alta calidad para las superficies de los electrodos. La obtención de productos de cadena más larga se ha descrito en términos de reacciones tipo Fischer Tropsch (8), pero también aquí las cadenas son de una longitud limitada. La fotorreducción en superficies semiconductoras irradiadas produce monóxido de carbono, formiato, metanol, metano, formaldehído, ácido oxálico y glicoxal. De nuevo, esta es una tecnología costosa y de bajo rendimiento.

- 45 Aunque se sabe que enzimas como la formiato deshidrogenasa bacteriana reducen el dióxido de carbono a formiato (9), la reacción directa (oxidación de formiato a dióxido de carbono) es favorecida generalmente porque se requiere NADPH para conducir la reacción y el potencial de reducción de NADP es más positivo que el del dióxido de carbono. Tal reacción también requiere moléculas donantes yceptoras de electrones. Las enzimas que contienen tungsteno de *Syntrophotobacterium fumioxidans* (10) pueden llevar a cabo esta reacción, pero requieren la absorción en la superficie de un electrodo para que el sistema electrocatalítico funcione de manera eficiente. Además, no se producen moléculas de combustible más largas.

- 55 La presente invención es una mejora en comparación con la técnica anterior en la que el dióxido de carbono puede convertirse en una molécula de plataforma inicial (ácido fórmico) y luego ensamblarse en cadenas más largas en un

formato rápido que no requiere fermentación o generación y procesamiento de biomasa. Esto mejora los métodos conocidos tales como los del documento US 2012/0003705 (11), que requiere la producción de biomasa y el reciclado de donantes y aceptores de electrones, y los documentos US 2010/03170741A1 (12), US 2012/0003706A1 (13), US 2012/003707A (14) y US 2012/0034664A1 (15), todos los cuales requieren procesos fermentativos.

5 Sumario de la invención.

Un nuevo microorganismo ha sido aislado por el autor de la presente solicitud, que es capaz de fijar el dióxido de carbono y convertirlo en una fuente de energía de ácido carboxílico alifático. Por tanto, en general, la invención se refiere a tal microorganismo que comprende un sistema de enzima hidrogenasa que puede convertir dióxido de carbono en ácido fórmico. El microorganismo también comprende un segundo sistema enzimático que puede convertir ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. Esto significa que los ácidos carboxílicos que se pueden producir tienen cinco o más átomos de carbono en total en el compuesto. Adicionalmente, el segundo sistema enzimático también puede producir ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de dos, tres y cuatro átomos de carbono. Estos ácidos carboxílicos de cadena más corta se convierten en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono.

El microorganismo aislado por el inventor, un *Acetobacter lovaniensis*, es adecuado para la producción de aceites sobre una base comercial. Este microorganismo usa dióxido de carbono como única fuente de carbono y produce ácidos carboxílicos de diversa longitud. El hecho de que el microorganismo use dióxido de carbono como única fuente de carbono significa que la producción de petróleo es mucho más asequible que para otros microorganismos a los que se debe suministrar un sustrato hidrocarbonado para realizar la misma tarea (16, 17, 18). El uso de dicho microorganismo para convertir el dióxido de carbono en un combustible es de valor comercial. Además, como el microorganismo no requiere un sustrato hidrocarbonado, se elimina la necesidad de producir cultivos energéticos.

La invención mejora los métodos actuales por cuanto el dióxido de carbono se convierte en un producto de combustible líquido sin necesidad de fermentación o de producción y procesamiento de biomasa. Además, la conversión de dióxido de carbono en moléculas de combustible es una opción muy atractiva, dado que es una fuente de carbono renovable libre y que su secuestro tiene efectos positivos para el medio ambiente.

Otras ventajas asociadas con el microorganismo aislado son que:

- 1) es un organismo no patógeno y está clasificado como Clase 1;
- 2) no requiere condiciones especiales de crecimiento ni grandes volúmenes de crecimiento como se requeriría para las algas;
- 3) tiene un sistema enzimático de hidrogenasa robusto;
- 4) el aceite se sintetiza externamente a la célula y por tanto es más fácil de cosechar y adaptar a un proceso de elaboración comercial;
- 5) el aceite producido consiste principalmente en ácidos carboxílicos de cadena larga; este aceite puede usarse directamente como fuente de energía por combustión, o usarse como materia prima en una serie de industrias, como en la producción de biodiesel, detergentes y diversos productos oleoquímicos;
- 6) el sistema enzimático funcionará en emulsiones de aceite-agua que se describen como una nueva vía de fabricación en la que el aceite de la emulsión actúa como imprimación para la formación de cadenas y aumenta la solubilidad del dióxido de carbono en los medios de reacción; y
- 7) el sistema enzimático opera sin necesidad de producir ni procesar biomasa.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de producción de la fuente de energía de ácido carboxílico alifático.

Estos y otros aspectos de la invención serán descritos con más detalle a continuación.

Descripción detallada de la invención.

En un aspecto de la invención, se proporciona un microorganismo que es la cepa *Acetobacter* que tiene el número de ingreso NCIMB 41808. Este microorganismo comprende un sistema de enzima hidrogenasa que es capaz de convertir dióxido de carbono en ácido fórmico, y un segundo sistema de enzima que es capaz de convertir ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un microorganismo, comprendiendo el método la modificación o mutación de la bacteria que tiene el número de ingreso NCIMB 41808 para producir el microorganismo, en donde el microorganismo puede convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico y puede producir ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono.

El microorganismo puede ser cualquier microorganismo adecuado, siempre que sea capaz de convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico y luego convertir el ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. Preferiblemente, el microorganismo es un procarionte. Más preferiblemente, el microorganismo es una bacteria. En una realización, el microorganismo es litotrófico. Es litotrófico un organismo que utiliza un sustrato inorgánico (normalmente de origen mineral) para obtener equivalentes reductores para su uso en la biosíntesis (por ejemplo, fijación del dióxido de carbono) o la conservación de energía a través de la respiración aeróbica o anaeróbica. El microorganismo puede ser litoautótrofo. Un litoautótrofo puede usar dióxido de carbono del aire como fuente de carbono. El microorganismo puede usar dióxido de carbono como única fuente de carbono. El microorganismo puede ser quimiolitotrófico. Los quimiolitotróficos usan compuestos inorgánicos para la respiración aeróbica o anaeróbica. La energía producida por la oxidación de estos compuestos es suficiente para la producción de ATP. Algunos de los electrones derivados de los donantes inorgánicos también necesitan ser canalizados a la biosíntesis. En una realización, el microorganismo es quimiolitotrófico.

Los términos "litotrófico", "litoautotrófico", "quimiolitotrófico" y "quimiolitotrófico" usados anteriormente son bien conocidos por los expertos en la técnica y tienen un significado que es ampliamente reconocido. Como resultado, una persona experta podría determinar fácilmente si un microorganismo en particular, como una bacteria, cae dentro de la definición de uno o más de estos términos. Además, una persona experta también podría probar cualquier microorganismo de interés para determinar si está clasificado en una o más de estas categorías. Una persona experta también podría ensayar un microorganismo para ver si puede producir un aceite de ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. Los expertos en la técnica conocen bien métodos adecuados para realizar tales ensayos.

En una realización, el microorganismo es un microorganismo aerobio. De nuevo, está dentro de la capacidad de una persona experta en la técnica determinar si un microorganismo concreto es un microorganismo aerobio. En el contexto de la presente invención, el microorganismo, y más en particular los sistemas enzimáticos del microorganismo, producen ácidos carboxílicos alifáticos en condiciones aeróbicas, es decir, la presencia de oxígeno se tolera en las reacciones que producen los ácidos carboxílicos alifáticos.

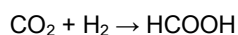
Cuando el microorganismo es una bacteria, el microorganismo puede ser cualquier bacteria adecuada que comprende un sistema enzimático de hidrogenasa capaz de convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico y un segundo sistema enzimático que es capaz de convertir el ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. Preferiblemente, la bacteria es una especie *Acetobacter*. En una realización particular, el microorganismo es *Acetobacter lovaniensis*. El microorganismo puede ser similar a la cepa *Acetobacter* que tiene el número de ingreso NCIMB 41808 (depositado en NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA) el 12 de enero de 2011, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest; denominado en adelante cepa FJ1). La expresión "similar a" significa un microorganismo que es funcionalmente equivalente a FJ1. El microorganismo debe tener un sistema enzimático de hidrogenasa que sea capaz de convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico y debe ser capaz de crecer en las mismas condiciones que FJ1. Además, el microorganismo debe comprender las mismas rutas enzimáticas o similares para producir ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. El microorganismo puede tener al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia con FJ1. En algunas realizaciones, el microorganismo puede tener al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75% o al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con FJ1. Preferiblemente, el microorganismo debe tener al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con FJ1. Son bien conocidos por los expertos en la técnica métodos para determinar la identidad de secuencia entre diferentes microorganismos. Por ejemplo, se puede usar el análisis 16S rDNA. La información detallada sobre el cultivo de FJ1 se proporciona a continuación. Por tanto, está dentro de la capacidad de una persona experta en la técnica determinar si un microorganismo es similar a FJ1.

En una realización en particular, el microorganismo puede ser un microorganismo recombinante, es decir, un microorganismo modificado genéticamente. El microorganismo puede comprender una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ADN) de otra especie de microorganismo. En particular, el microorganismo puede comprender un gen heterólogo o genes que codifican el sistema enzimático de hidrogenasa. El gen o genes heterólogos pueden estar unidos operativamente a un promotor heterólogo o a un promotor del microorganismo. El gen o genes heterólogos pueden ser parte de un plásmido (22). El gen o genes heterólogos se expresarán en el microorganismo produciendo un sistema enzimático de hidrogenasa funcional que permite al microorganismo convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico. Los expertos en la técnica conocen los métodos adecuados para introducir secuencias de nucleótidos (por ejemplo ADN) de interés en células hospedadoras de microorganismos (por ejemplo, véase Sambrook, J. y Russell, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Harbor Laboratory Press, EE. UU.).

El microorganismo se deriva de FJ1. La expresión "derivado de" significa que FJ1 se modifica o muta para producir otros microorganismos. Por ejemplo, los genes pueden insertarse o eliminarse de FJ1. Los microorganismos que se derivan de FJ1 deben ser funcionalmente equivalentes a FJ1 y deben tener un sistema enzimático de hidrogenasa que sea capaz de convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico. Además, los microorganismos derivados deben ser capaces de crecer en las mismas condiciones que FJ1. Más aún, los microorganismos derivados deben

comprender rutas enzimáticas iguales o similares para producir ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. Los microorganismos derivados pueden producir ácidos carboxílicos alifáticos de la misma manera que FJ1. En algunas realizaciones, los microorganismos pueden derivarse cultivando y seleccionando repetidamente microorganismos en un proceso de selección artificial.

- 5 El sistema enzimático de hidrogenasa puede ser cualquier sistema enzimático adecuado que sea capaz de convertir dióxido de carbono en ácido fórmico. El sistema enzimático de hidrogenasa cataliza la conversión del dióxido de carbono en ácido fórmico. El sistema enzimático de hidrogenasa oxida el hidrógeno generando los electrones para reducir el dióxido de carbono a ácido fórmico, por ejemplo, usando la siguiente reacción:



- 10 Generalmente, la catálisis de la conversión del dióxido de carbono en ácido fórmico tiene lugar en solución ya que el dióxido de carbono es soluble. En solución, el dióxido de carbono se convierte reversiblemente en ácido carbónico (H_2CO_3). Dependiendo del pH de la solución, el ácido carbónico estará presente normalmente en forma de bicarbonato (HCO_3^-) o carbonato (CO_3^{2-}). Por tanto, la conversión de dióxido de carbono en ácido fórmico por el sistema enzimático de hidrogenasa de la presente invención también abarca la conversión de bicarbonato y/o carbonato en ácido fórmico. En otras palabras, se considera que el carbonato y el bicarbonato son formas de dióxido de carbono en la presente invención. Pueden añadirse a la solución sales bicarbonato y/o carbonato (como bicarbonato de sodio o carbonato de sodio) para aumentar el nivel de estas sales. Sin embargo, esto no es lo preferido, ya que los iones de la sal (por ejemplo, los iones de sodio) pueden formar jabón cuando se producen los ácidos carboxílicos alifáticos.

- 20 Como se indicó anteriormente, el dióxido de carbono es preferiblemente la única fuente de carbono. Preferiblemente, el dióxido de carbono se convierte directamente de dióxido de carbono en ácido fórmico sin que se formen productos intermedios estables. En otras palabras, la reacción ocurre en una sola etapa. El carbonato y el bicarbonato se han de considerar como formas de dióxido de carbono que están en solución y no son productos intermedios. Por tanto, la disolución del dióxido de carbono en iones carbonato y bicarbonato en solución y luego en ácido fórmico se considera que es una conversión directa. Por otra parte, la conversión de dióxido de carbono (o iones carbonato y/o bicarbonato) en metanol y luego en ácido fórmico no se considera una conversión directa ya que se produce un intermedio de metanol.

- En algunas realizaciones, los reactivos de partida para producir ácido fórmico son agua y dióxido de carbono. En realizaciones preferidas, no son necesarios otros reactivos para producir ácido fórmico, distintos del dióxido de carbono y el agua. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que otros componentes estén presentes en la mezcla de reacción inicial. Por ejemplo, puede estar presente un agente oxidante para acelerar el inicio de las reacciones. Dichos otros componentes no son reactivos en la producción de ácido fórmico.

- El sistema enzimático de hidrogenasa no requiere moléculas aceptoras de electrones y donantes para producir ácido fórmico. Por ejemplo, no se requieren moléculas como NADP y NADPH para que prosiga la reacción. De hecho, todas las reacciones para producir los ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más carbonos no requieren aceptor de electrones ni moléculas donantes.

- El sistema enzimático de hidrogenasa no usa la fermentación para producir ácido fórmico. Además, tampoco el segundo sistema enzimático usa la fermentación para producir los ácidos carboxílicos alifáticos. La fermentación es la conversión de compuestos orgánicos como los carbohidratos en otros compuestos a través de procesos bioquímicos que involucran aceptores y/o donantes de electrones.

El sistema enzimático de hidrogenasa no requiere biomasa para producir ácido fórmico. Por consiguiente no es necesario proporcionar biomasa al microorganismo para que se produzcan ácidos carboxílicos alifáticos. La biomasa es un material orgánico biológico de plantas o animales que se puede convertir en una fuente de energía.

- En la presente invención no es necesario usar un proceso electroquímico tal como electrocatálisis para convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico y luego en ácidos carboxílicos alifáticos. Un proceso electroquímico es una reacción química que tiene lugar en una solución en la interfase de un conductor de electrones (un metal o un semiconductor) y un conductor iónico (el electrolito), y que implica la transferencia de electrones entre el electrodo y el electrolito o la especie en solución.

- El sistema enzimático de hidrogenasa es preferiblemente tolerante al oxígeno. Esto significa que el sistema de la enzima hidrogenasa puede tolerar niveles relativamente altos de oxígeno sin dañar el sistema enzimático ni afectar la actividad del sistema enzimático. Preferiblemente, el sistema enzimático de hidrogenasa puede funcionar a un nivel de oxígeno de más de aproximadamente 10%, más preferiblemente, a un nivel de oxígeno de más de aproximadamente 15%, e incluso más preferiblemente a un nivel de oxígeno de entre aproximadamente 20% y aproximadamente 21%, p. ej al nivel de oxígeno que se encuentra en la atmósfera (aproximadamente 20,95%). Muchas enzimas hidrogenasa son sensibles a la presencia de oxígeno y dejan de funcionar eficazmente cuando está presente el oxígeno. Preferiblemente, el sistema de la enzima hidrogenasa es extracelular, es decir, está fuera de la célula del microorganismo. En otras palabras, el sistema enzimático de hidrogenasa se coloca fuera de la membrana celular. Está orientado extracelularmente. Preferiblemente, el sistema enzimático de hidrogenasa es

completamente extracelular, de modo que no está unido al microorganismo de ninguna forma, por ejemplo, estando unido a la membrana celular del microorganismo. Esto permite ventajosamente que la formación de ácido fórmico tenga lugar fuera de la célula del microorganismo. El sistema enzimático de hidrogenasa es preferiblemente funcional entre pH 3,0 y 8,5 y, más preferiblemente, entre pH 3,5 y 4,5. Además, el sistema enzimático de hidrogenasa es preferiblemente funcional entre 5 °C y 60 °C y, más preferiblemente, entre 15 °C y 20 °C.

El sistema enzimático de hidrogenasa puede comprender una o más enzimas, además de la enzima hidrogenasa, para ayudar a la conversión del dióxido de carbono en ácido fórmico.

En una realización, el sistema enzimático de hidrogenasa es el de FJ1.

El microorganismo comprende también un segundo sistema enzimático que es capaz de convertir el ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. El segundo sistema enzimático puede ser cualquier sistema de enzima adecuado que sea capaz de convertir el ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. El segundo sistema enzimático cataliza la conversión del ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. Los ácidos carboxílicos alifáticos pueden usarse p. ej. en combustión, para producir energía.

Preferiblemente, el segundo sistema enzimático es extracelular, es decir, fuera de la célula. En otras palabras, el segundo sistema enzimático está situado fuera de la membrana celular. El segundo sistema enzimático se orienta extracelularmente. Esto significa que la conversión del ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos tiene lugar extracelularmente. Esto permite ventajosamente que los ácidos carboxílicos alifáticos sean extraídos fácilmente una vez producidos por el microorganismo. Preferiblemente el segundo sistema enzimático es completamente extracelular de manera que no está unido al microorganismo de ninguna manera, por ejemplo uniéndose a la membrana celular del microorganismo.

En una forma de realización, el segundo sistema enzimático es el de FJ1.

Como se indicó anteriormente, el microorganismo puede ser un microorganismo recombinante. Por tanto, el microorganismo puede comprender uno o más genes heterólogos que codifican el segundo sistema enzimático. El gen o genes heterólogos pueden estar unidos operativamente a un promotor heterólogo o a un promotor del microorganismo. El gen o genes heterólogos pueden ser parte de un plásmido. El gen o genes heterólogos se expresarán en el microorganismo para producir un segundo sistema enzimático funcional que permite al microorganismo convertir el ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos con una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono.

La naturaleza precisa de los ácidos carboxílicos alifáticos que son producidos por el microorganismo dependerán, en parte, de la duración del tiempo de las reacciones enzimáticas.

Los ácidos carboxílicos alifáticos producidos por el microorganismo pueden tener una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono. Los ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de dos, tres y cuatro átomos de carbono también son producidos por el microorganismo. Los ácidos carboxílicos alifáticos que se producen pueden ser ácidos grasos. Los ácidos carboxílicos alifáticos pueden ser ácidos carboxílicos alifáticos de cadena corta, de cadena media o de cadena larga, o una combinación de estos.

El término "alifático", en el contexto de los ácidos carboxílicos alifáticos, significa que el grupo unido al grupo -COOH del ácido carboxílico comprende una cadena de átomos de carbono unidos formando la cadena principal del grupo. Esta cadena principal de carbono puede ser ramificada o no ramificada. Preferiblemente, la cadena principal de carbono no está ramificada. La cadena principal de carbono puede ser saturada, monoinsaturada (es decir, un doble enlace carbono-carbono) o poliinsaturada (es decir, más de un doble enlace carbono-carbono). En una realización, la cadena principal de carbono es monoinsaturada. La cadena principal de carbono está generalmente unida a átomos de hidrógeno (distintos del grupo -COOH). Sin embargo, en vez de uno o más de los átomos de hidrógeno, la cadena principal de carbono puede estar sustituida con otros grupos tales como los grupos OH. Preferiblemente, la cadena principal de carbono es no sustituida, es decir, solo átomos de hidrógeno están unidos a la cadena principal de carbono distintos del grupo -COOH.

El segundo sistema enzimático del microorganismo que produce los ácidos carboxílicos alifáticos a partir de ácido fórmico lo hace de manera escalonada. Se añade un átomo de carbono de uno en uno a la cadena principal de carbono de los ácidos carboxílicos alifáticos. Esto produce una gama de ácidos carboxílicos que tienen una cadena principal de carbono de C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, etc. Por ejemplo, comenzando con el ácido fórmico (C1), el segundo sistema enzimático puede agregar un átomo de carbono a la cadena principal de carbono del ácido fórmico para producir ácido acético (C2). Luego, el segundo sistema enzimático puede agregar un átomo de carbono a la cadena principal de carbono del ácido acético para producir ácido propiónico (C3). Este proceso puede continuar de forma que puede producirse secuencialmente ácido butírico (C4), ácido valérico (C5), ácido hexanoico (C6), ácido heptanoico (C7), ácido octanoico (C8), ácido nonanoico (C9), ácido decanoico (C10), etc. Por tanto, el segundo sistema enzimático es capaz de convertir ácido fórmico en un ácido carboxílico alifático que tiene una longitud de cadena de dos o más átomos de carbono, tres o más átomos de carbono, cuatro o más átomos de

carbono, cinco o más átomos de carbono, seis o más átomos de carbono, siete o más átomos de carbono, ocho o más átomos de carbono, nueve o más átomos de carbono, diez o más átomos de carbono, etc. El segundo sistema enzimático puede catalizar la adición de un átomo de carbono (por ejemplo, una unidad CH₂) a la cadena carbonada de ácidos carboxílicos alifáticos.

5 De esta forma, los sistemas enzimáticos del microorganismo pueden producir una gama de ácidos carboxílicos alifáticos de distinta longitud. Por ejemplo, el microorganismo puede producir una gama de ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de la cadena principal de carbono entre aproximadamente 2 y aproximadamente 24 átomos de carbono, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 24 átomos de carbono, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 24 átomos de carbono o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 24 átomos de carbono. Además, el microorganismo puede producir una gama de ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de la cadena principal de carbono de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 24 átomos de carbono, entre aproximadamente 7 y aproximadamente 24 átomos de carbono, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 24 átomos de carbono o entre aproximadamente 9 y aproximadamente 24 átomos de carbono. Adicionalmente, el microorganismo puede producir una gama de ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de la cadena principal de carbono de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 24 átomos de carbono, entre aproximadamente 11 y aproximadamente 24 átomos de carbono, entre aproximadamente 12 y aproximadamente 24 átomos de carbono o entre aproximadamente 13 y aproximadamente 24 átomos de carbono. Cuando se cultiva el microorganismo, es probable que la longitud de la cadena de hidrocarburos sea más larga si el microorganismo se cultiva durante más tiempo ya que los sistemas enzimáticos habrán estado activos durante más tiempo. El tiempo durante el cual se cultiva el microorganismo determina la longitud media de la cadena. En una forma de realización, el contenido de ácido carboxílico alifático calculado como C18 está entre aproximadamente 70% y 90%. Más preferiblemente, el contenido de ácido carboxílico alifático calculado como C18 es aproximadamente 80%.

25 Preferiblemente, los ácidos carboxílicos alifáticos producidos por el microorganismo son combustibles. Preferiblemente, los ácidos carboxílicos alifáticos producidos por el microorganismo están en forma de aceite. Esto hace que la separación de los ácidos carboxílicos alifáticos sea más fácil. El aceite puede ser un aceite semiseco. Puede evaluarse si un aceite es semiseco a partir del índice de yodo. Los métodos de análisis estándar son, por ejemplo, EN 14111. Preferiblemente, el índice de yodo del aceite es 85 - 95 mg I/100 g. Más preferiblemente, el índice de yodo del aceite es 90 - 95 mg I/100 g. Los ácidos carboxílicos alifáticos pueden ser monoinsaturados.

30 Un barrido de infrarrojo de los ácidos carboxílicos alifáticos producidos por un microorganismo de la invención se puede ver en la Figura 1. Esto indica que la muestra, que es un aceite, está constituida por ácidos carboxílicos de cadena larga y es un ácido carboxílico alifático.

Los ácidos carboxílicos alifáticos, una vez extraídos, pueden tener una o más de las siguientes propiedades:

Análisis	Valor típico	Método de análisis
Cenizas g/100 g	0,025 – 0,050	ISO 3987
Punto de inflamación °C	> 100	EN ISO 3679
Viscosidad cinemática cSt		EN ISO 3104
a 20 °C	70 – 75	
a 30 °C	52 – 57	
a 40 °C	47 – 52	
a 50 °C	30 – 35	
a 60 °C	20 – 25	
a 70 °C	15 – 20	
a 80 °C	10 – 15	
a 90 °C	7 – 12	
Índice de viscosidad	55	ASTM D2270
Contenido de agua g/100 g	< 0,5	EN ISO 12937
Densidad kg/l a 20°C	920 – 950	EN ISO 12185

ES 2 672 874 T3

Análisis	Valor típico	Método de análisis
Índice de acidez mg KOH/g	140 – 160	EN 14104
Índice de yodo mg I/100 g	85 – 95	EN 14111
Corrosión en lámina de cobre	1B	ASTM D849
Estabilidad de oxidación H	> 48 horas	ASTM D2274
Azufre % m/m	< 0,1 (típicamente 0,05)	ASTM D2622
Índice de peróxido meq/kg	< 3	AOAC 965.33
Índice de cetano	~50	ASTM D976
Poder calorífico superior MJ/kg	> 37	ASTM D5865
Potencial de sedimentación	< 0,2 (típicamente 0,08)	ASTM D-6469

En algunas realizaciones, la viscosidad cinemática (cSt) a 40 °C puede ser de 20 – 25. Además, el punto de inflamación puede ser superior a 180 °C.

5 Se ha encontrado que la estabilidad de oxidación de los ácidos carboxílicos alifáticos es sorprendentemente alta en comparación con otros biocombustibles tales como el biodiesel. El biodiesel normal tiene una estabilidad de oxidación de aproximadamente 30 minutos (cuando se ensaya con ASTM D2274). Los ácidos carboxílicos alifáticos tienen una estabilidad de oxidación de más de 48 horas.

10 Se muestra a continuación una composición típica para aceites producidos después de diferentes periodos de reacción. Estas tablas muestran el punto de ebullición de las diversas fracciones. Así, cuando se fraccionan los ácidos carboxílicos alifáticos, las fracciones se dividen en bandas y se mide el punto de ebullición de estas fracciones. Por ejemplo, el primer 10% de los ácidos carboxílicos alifáticos cuando se fraccionan tendrán un determinado punto de ebullición. El segundo 10% (es decir, 10 – 20% denominado a continuación como 20%) tendrá otro punto de ebullición, y así sucesivamente.

Intervalo típico de destilación de una fracción más pesada producida por reacción durante 1,5 horas.

Porcentaje de destilado	Punto de ebullición °C
Punto de ebullición inicial	188
10%	232
20%	256
30%	272
40%	292
50%	306
60%	321
70%	332
80%	359
90%	391
Punto de ebullición final	395

15

Intervalo típico de destilación de una fracción más ligera producida por reacción durante 0,5 horas.

Porcentaje de destilado	Punto de ebullición °C

Punto de ebullición inicial	99
10%	113
20%	115
30%	118
40%	118
50%	119
60%	121
70%	129
80%	308
90%	370
Punto de ebullición final	395

La descripción anterior relacionada con el microorganismo de la invención y sus características preferibles, son igualmente aplicables a los métodos para producir el microorganismo. Por ejemplo, las características particulares relacionadas con la naturaleza del microorganismo son también aplicables a los métodos.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir ácidos carboxílicos alifáticos, comprendiendo el método cultivar un microorganismo que es la cepa *Acetobacter* que tiene el número de ingreso NCIMB 41808.

10 Como se indicó anteriormente, pueden producirse ácidos carboxílicos alifáticos que tienen un intervalo de longitudes de cadena principal de carbono. Preferiblemente se producen ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena principal de carbono de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 24 átomos de carbono. Más preferiblemente, se producen ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena principal de carbono de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 24 átomos de carbono. Aún más preferiblemente, se producen ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena principal de carbono de entre aproximadamente 16 y aproximadamente 20 átomos de carbono. En una forma de realización, los ácidos carboxílicos alifáticos tienen una longitud de cadena principal de carbono de más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Además, los ácidos carboxílicos alifáticos pueden tener una longitud de cadena principal de carbono de menos de 25.

15 Alternativamente, el contenido de ácido carboxílico alifático calculado como C18 está entre aproximadamente 70% y 90%. Más preferiblemente, el contenido de ácido carboxílico alifático calculado como C18 es aproximadamente 80%.

20 Pueden usarse unas condiciones cualquiera adecuadas para cultivar el microorganismo. El microorganismo se puede cultivar a un pH de entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 8,5 y, más preferiblemente, entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5. Además, el microorganismo se puede cultivar a una temperatura de entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 60 °C y, más preferiblemente, entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 20 °C.

25 La solución de cultivo contendrá dióxido de carbono. Este puede ser dióxido de carbono que se ha disuelto procedente del aire. Preferiblemente, se burbujea gas de dióxido de carbono a través de la solución de cultivo para aumentar el nivel de dióxido de carbono disponible para reaccionar. Cuando se burbujea dióxido de carbono a través de la solución de cultivo, puede provenir de un cilindro de gas comprimido. Alternativamente, puede estar contenido en un gas de otra fuente. Por ejemplo, los gases residuales de la combustión se pueden burbujear a través del medio de cultivo.

30 En algunas realizaciones, se puede hacer burbujear dióxido de carbono (por ejemplo, gases residuales de la combustión) a través de la solución de cultivo (que puede contener opcionalmente un agente secuestrante de dióxido de carbono) antes de la adición del microorganismo.

Preferiblemente, el microorganismo se cultiva con dióxido de carbono como única fuente de carbono.

35 El medio en el que tiene lugar el cultivo del microorganismo puede ser cualquier medio adecuado. Preferiblemente, el dióxido de carbono es la única fuente de carbono en el medio (como se mencionó anteriormente, HCO_3^- y CO_3^{2-} se consideran formas solubles de dióxido de carbono y están englobados en el término dióxido de carbono. El medio de cultivo puede comprender uno o más de los siguientes componentes: KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CaCO_3 ; CuSO_4 ; FeCl_3 ; MnCl_3 ; MoCl_3 ; y ZnCl_3 . Además, estos componentes pueden estar presentes en el medio de cultivo en las concentraciones siguientes:

NUTRIENTE	g/litro
KH ₂ PO ₄	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10
CaCO ₃	0,10
CuSO ₄	0,10
FeCl ₃	0,01
MnCl ₃	0,01
MoCl ₃	0,01
ZnCl ₃	0,01

5 Preferiblemente, el microorganismo se cultiva en solución en una emulsión de aceite en agua. Esto se puede conseguir introduciendo algo de aceite en el medio de cultivo y agitando la mezcla de aceite y agua para que forme una emulsión. Por ejemplo, se puede usar la circulación de la mezcla de reacción. Se cree que usando una emulsión de aceite en agua se ayuda a aumentar la solubilidad del dióxido de carbono. También se cree que esto contribuye a mantener en solución los ácidos carboxílicos alifáticos, de manera que su longitud de cadena pueda seguir aumentando.

10 Preferiblemente, se introduce un agente secuestrante de dióxido de carbono en la mezcla de reacción. Esto ayuda a aumentar el nivel de dióxido de carbono en la mezcla/solución de reacción para mantener/aumentar la velocidad de reacción. Los agentes secuestrantes de dióxido de carbono adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen compuestos alcalinos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, cloruro de bario, trietanolamina, dietanolamina, monoetanolamina, amoníaco, metanol, sulfolano, éteres de polietilenglicol, polietilenglicoles, glicerol, y agentes tensioactivos tales como la serie Triton TX. Algunos agentes secuestrantes de dióxido de carbono adecuados se describen en Ortrud Ashenbrenner y Peter Styring (2010) (21). Preferiblemente, el agente secuestrante de dióxido de carbono es trietanolamina o polietilenglicol. En algunas realizaciones, el agente secuestrante de dióxido de carbono es trietanolamina. En otras realizaciones, el agente secuestrante de dióxido de carbono es un polietilenglicol tal como PEG 300. Ventajosamente, los polietilenglicoles no requieren una reacción química para liberar el dióxido de carbono, no contienen nitrógeno que pueda formar potencialmente emisiones de NOX en la combustión, no forman jabones, y ayudan a reducir las cenizas en el producto final.

20 Preferiblemente, en la mezcla de reacción se introduce un agente oxidante. Esto contribuye a iniciar el proceso de reacción y acelera el inicio de la reacción. Los agentes oxidantes adecuados incluyen hipoclorito de sodio e hidróxido de sodio. El agente oxidante debe ser un agente oxidante suave. En una realización, puede usarse la lejía como agente oxidante.

El método puede comprender además la etapa de separar los ácidos carboxílicos alifáticos.

25 Como se indicó anteriormente, se pueden producir ácidos carboxílicos alifáticos que tienen un intervalo de longitudes de cadena principal de carbono. Preferiblemente, los ácidos carboxílicos alifáticos tienen una longitud de cadena principal de carbono de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 24 átomos de carbono. Más preferiblemente, los ácidos carboxílicos alifáticos tienen una longitud de cadena principal de carbono de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 24. Aún más preferiblemente, los ácidos carboxílicos alifáticos tienen una longitud de cadena principal de carbono de entre aproximadamente 16 y aproximadamente 20 átomos de carbono. Alternativamente, el contenido de ácido carboxílico alifático calculado como C18 está entre aproximadamente 70% y 90%. Más preferiblemente, el contenido de ácido carboxílico alifático calculado como C18 es aproximadamente 80%.

30 Preferiblemente, los ácidos carboxílicos alifáticos están en forma de un aceite. Esto hace que la separación de los ácidos carboxílicos alifáticos sea más fácil. El aceite puede ser un aceite semiseco. Preferiblemente, los ácidos carboxílicos alifáticos son monoinsaturados.

Los ácidos carboxílicos alifáticos, una vez extraídos, pueden tener una o más de las siguientes propiedades:

Análisis	Valor típico
Cenizas g/100 g	0,025 – 0,050
Densidad a 15°C	0,8483 – 0,8720

Punto de inflamación °C	> 100
Viscosidad cinemática cSt	
a 20 °C	70 – 75
a 30 °C	52 – 57
a 40 °C	47 – 52
a 50 °C	30 – 35
a 60 °C	20 – 25
a 70 °C	15 – 20
a 80 °C	10 – 15
a 90 °C	7 – 12
Índice de viscosidad	55
Contenido de agua g/100 g	1 max (pref. < 0,5)
Índice de acidez mg KOH/g	140 – 160
Índice de yodo mg I/100 g	85 – 95
Corrosión en lámina de cobre	1B
Estabilidad de oxidación H	48 +
Azufre % m/m	< 0,1
Índice de peróxido meq/kg	< 3
Índice de cetano	~50
Poder calorífico superior MJ/kg	> 37
Potencial de sedimentación	< 0,2 (típicamente 0,08)

La invención también proporciona el uso de los microorganismos descritos anteriormente para producir ácidos carboxílicos alifáticos.

- 5 En una realización, las enzimas responsables de la conversión del dióxido de carbono en ácido fórmico, y después en ácidos carboxílicos alifáticos, son extracelulares respecto al microorganismo. Estas enzimas funcionan al margen de si están o no presentes las células del microorganismo. Por tanto, en otro aspecto de la invención se proporciona un método para producir ácidos carboxílicos alifáticos, comprendiendo el método producir ácidos carboxílicos alifáticos usando un medio que comprende un sistema enzimático de hidrogenasa que es capaz de convertir dióxido de carbono en ácido fórmico y un segundo sistema enzimático que es capaz de convertir ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono.

- 10 El medio puede producirse cultivando el microorganismo durante un período de tiempo para permitir que los sistemas enzimáticos se produzcan en el medio. Si se desea, es posible producir un extracto libre de células que contiene las enzimas pero no las células del microorganismo. Esto puede hacerse, por ejemplo, eliminando las células del microorganismo del medio después del cultivo, por ejemplo mediante ultrafiltración repetida.
- 15 Alternativamente, en lugar de eliminar del medio las células del microorganismo, las células pueden dejarse en el medio pero matarlas, por ejemplo, introduciendo un agente desinfectante o antimicrobiano en el medio. Alternativamente, los microorganismos pueden dejarse en el medio.

El método puede comprender además preparar el medio antes de producir los ácidos carboxílicos alifáticos usando el medio.

- 20 Se puede usar cualquiera de las condiciones adecuadas para producir los ácidos carboxílicos alifáticos. Por ejemplo, se proporcionan dióxido de carbono y agua. El medio puede tener un pH de entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 8,5 y, más preferiblemente, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0. Además, el

medio puede tener una temperatura de entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 60°C y, más preferiblemente, entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 20 °C.

5 Al igual que con el primer método, preferiblemente se usa dióxido de carbono como única fuente de carbono, por ejemplo, burbujeando dióxido de carbono gas a través del medio de reacción. Preferiblemente, el medio de reacción es una emulsión de aceite en agua. Además, preferiblemente se introduce en el medio de reacción un agente secuestrante de dióxido de carbono.

El método puede comprender además la etapa de separar los ácidos carboxílicos alifáticos.

10 En todas las formas de realización de los métodos de producción de ácido carboxílico alifático descritos anteriormente, una vez que se han producido los ácidos carboxílicos alifáticos se pueden llevar a cabo diversas etapas opcionales sobre los ácidos carboxílicos alifáticos. Por ejemplo, los métodos pueden comprender opcionalmente una o más de las etapas siguientes:

- 1) separar los ácidos carboxílicos alifáticos,
- 2) filtrar los ácidos carboxílicos alifáticos,
- 15 3) mezclar los ácidos carboxílicos alifáticos con un combustible diferente, preferiblemente un combustible de aceite;
- 4) convertir químicamente los ácidos carboxílicos, por ejemplo en ésteres, alcoholes, cetonas o aldehídos; y
- 5) destilar ciertas fracciones de los ácidos carboxílicos alifáticos.

20 Además, se proporciona un método para producir ácidos carboxílicos alifáticos, comprendiendo el método convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico y después convertir el ácido fórmico en ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono, en donde las reacciones de conversión tienen lugar en una emulsión de aceite en agua.

Ejemplos.

La invención se describirá ahora detalladamente a título de ejemplo solo con referencia a las figuras, en las que:

25 La Figura 1 es un barrido de infrarrojos de una fuente de energía producida por el microorganismo de la invención. La fuente de energía es un producto oleoso que comprende ácidos carboxílicos alifáticos y el barrido de infrarrojos muestra características químicas típicas de un ácido carboxílico alifático.

La Figura 2 muestra un primer sistema de tanque que puede usarse para producir aceite de acuerdo con la invención.

30 La Figura 3 muestra un segundo sistema de tanque que puede usarse para producir aceite de acuerdo con la invención.

La Figura 4 es un diagrama de flujo que muestra el proceso para producir aceite usando el segundo sistema de tanque.

La descripción que sigue no limita en modo alguno el alcance de la invención.

Descripción general.

35 Se discutirán los siguientes aspectos de la invención:

- 1) Propiedades del cultivo bacteriano;
- 2) producción de bloques de construcción de carbono (ácido fórmico);
- 3) ensamblaje de bloques de construcción en ácidos carboxílicos alifáticos de cadena corta, media y larga; y
- 4) el producto.

40 El cultivo bacteriano.

El cultivo bacteriano tiene preferiblemente las siguientes propiedades:

- Es un organismo aeróbico quimiolitotrófico que crece en dióxido de carbono como única fuente de carbono.
- Posee un sistema enzimático de hidrogenasa tolerante al oxígeno que es extracelular. Este sistema enzimático debe ser estable y activo entre pH 3,0 y 8,5 y entre 5 °C y 60 °C.

- Posee un componente de enzima extracelular capaz de ensamblar ácido fórmico en moléculas de hidrocarburo de cadena corta, media y larga con una funcionalidad de ácido carboxílico.
- Es capaz de formar un producto similar al aceite con valores típicos como se especifica a continuación. El aceite debe sintetizarse extracelularmente y separarse físicamente en la parte superior del medio de reacción.

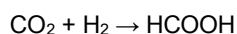
5

En una forma de realización, la bacteria es *Acetobacter lovaniensis* FJ1.

Producción de bloques de construcción de un carbono (ácido fórmico).

El microorganismo debe reducir el dióxido de carbono a ácido fórmico utilizando un sistema enzimático de hidrogenasa. El hidrógeno se oxida para generar electrones que reducen el dióxido de carbono a ácido fórmico de la siguiente manera:

10



Este sistema enzimático funciona en un extracto libre de células que implica actividad extracelular.

Ensamblaje del ácido fórmico en hidrocarburos de cadena corta, media y larga.

El microorganismo debería ser capaz de generar ácido fórmico y formar moléculas más complejas mediante la adición de ácido fórmico en etapas. Se forman altos niveles de ácido fórmico y se mantiene un nivel mínimo de 250 g por litro de equivalentes de ácido fórmico. Esto es cuando el nivel de acidez se calcula como ácido fórmico. Los ácidos carboxílicos alifáticos de cadena corta se forman primero.

15

Ácido volátil	5 días de cultivo mg/L	10 días de cultivo mg/L
Ácido acético (C2)	152	619
Ácido propiónico (C3)	406	1840
Ácido butírico (C4)	276	1220
Ácido valérico (C5)	272	1250
Ácido isobutírico (C4)	< 50	< 50
Ácido isovalérico (C5)	< 50	< 50

La presencia de ácidos carboxílicos alifáticos C2, C3, C4 y C5 implica la adición gradual de ácido fórmico, ya que están representadas longitudes de cadena impares y pares. El ácido isobutírico y el isovalérico estaban ausentes o por debajo del nivel de detección, lo que demuestra que se produjeron ácidos carboxílicos alifáticos de cadena lineal. La cantidad de cualquier ácido carboxílico alifático dado aumenta con el tiempo.

20

El sistema se mantiene entonces en equilibrio entre la producción de ácido fórmico y la formación de moléculas más grandes. En el equilibrio, la cantidad de aceite generado (medida por el peso seco) es 5 – 10% de la acidez medida como equivalentes de ácido fórmico. El aceite se genera entonces sobre una base continua mediante la eliminación de una capa oleosa en la interfase líquida del aire y la adición de un volumen igual de medio fresco. La capa oleosa superior se agrupa y se concentra.

25

El producto oleoso consiste en una mezcla de ácidos carboxílicos de diferentes longitudes de cadena. La longitud de la cadena se ajusta por la velocidad de eliminación desde cultivo primario. La longitud de la cadena y las proporciones de las moléculas generadas se varían ajustando las condiciones de reacción y el tipo de equipo utilizado. Los tipos de reactores que pueden usarse incluyen, pero sin limitarse a ellos, reactores de tandas, continuos y semicontinuos. Los tipos de reactores incluyen, pero sin limitarse a ellos, reactores cerrados, reactores abiertos, reactores agitados por paletas, reactores de circulación y reactores de elevación por gas.

30

La producción de aceite puede realizarse sobre la base de una forma semicontinua. El organismo se mantiene en cultivo por tandas utilizando un medio mínimo como se detalla en la tabla que sigue. Este es el "cultivo madre".

35

NUTRIENTE	g/litro
KH ₂ PO ₄	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10

NUTRIENTE	g/litro
CaCO ₃	0,10
CuSO ₄	0,01
FeCl ₃	0,01
MnCl ₃	0,01
MoCl ₃	0,01
ZnCl ₃	0,01

El pH del medio se ajusta a $4,0 \pm 0,2$. La acidez en el cultivo madre se mantiene en 20 – 25%, calculada como ácido fórmico.

5 Antes de su uso en un tanque de reacción, el medio de cultivo de células se diluye 1/10 en agua y se mantiene en un tanque intermedio. Este es el cultivo de trabajo.

El aceite se produce en tanques de reacción que incluyen, pero sin limitarse a ellos, los sistemas de tanques que se describen a continuación. Las fuentes de dióxido de carbono incluyen, pero sin limitarse a ellas, dióxido de carbono atmosférico, iones carbonato y bicarbonato, aguas residuales que contienen iones carbonato o bicarbonato, gas comprimido y gases de escape que contienen dióxido de carbono.

10 Sistema de tanque 1.

El tanque de reacción es un tanque alargado y estrecho (Figura 2) construido de material de plástico o recubierto de plástico. Se colocan conectores hembra de un tamaño adecuado en el costado del tanque para permitir la adición de medios o la extracción del producto. La dimensión típica sería de 5 unidades de largo por 1 a 1,5 unidades de ancho y de 0,5 a 1,0 unidades de profundidad. Se establece una partición en el tanque a 1/5 desde un extremo del tanque. 15 Esta partición es 4/5 de la altura del tanque. Se añaden a cada partición bombas circulantes con mangueras. También se puede añadir una barra de aspersión para la recirculación del contenido a cada partición. Puede añadirse adicionalmente dióxido de carbono comprimido al tanque de reacción a través de un cilindro de gas y una tubería. Puede situarse un calentador o una lámpara calefactora sobre la más pequeña de las dos secciones del tanque.

20 Para iniciar la producción de aceite en el tanque de reacción, la sección más grande del recipiente de reacción se llena con medio de cultivo madre. Luego se hace circular el medio hasta que el pH ha aumentado a un valor entre 5 y 7, y se separa aceite en la superficie superior. Entonces se desconecta la bomba.

25 Alternativamente, para iniciar la producción de aceite en el tanque de reacción, la sección más grande del recipiente de reacción se llena con medio de cultivo madre y se añade una pequeña cantidad de aceite para que actúe como imprimador. El aceite y el cultivo madre se mezclan por circulación hasta que se forma una emulsión. Se bombea dióxido de carbono adicional a través de la mezcla de reacción hasta que tiene lugar la conversión de la emulsión en aceite. La conversión en aceite se mide por la reducción del nivel de agua en la mezcla de reacción.

30 El aceite puede extraerse de la superficie superior arrastrando un colector de grasa o *boom* a través de la superficie superior, desplazando el aceite a la más pequeña de las dos secciones del tanque. El volumen desplazado se reemplaza por un volumen igual de medio de cultivo madre.

Cuando la partición está llena y la reacción se termina, el aceite se bombea a un tanque de sedimentación vertical y se deja reposar. Se añade un agente antimicrobiano y el agua se deja que sedimente. El agua se elimina a través de la válvula inferior.

35 El aceite puede procesarse adicionalmente por filtración o por eliminación de agua a niveles específicos usando filtros desmenuzantes o agentes de secado.

En un método alternativo, 2 litros de medio de cultivo que contiene 20% de bacterias se mezclan con desinfectante para matar las bacterias antes de comenzar la producción de aceite. Este medio de cultivo contiene las enzimas necesarias para convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico y después en ácidos carboxílicos alifáticos.

40 El medio de cultivo que contiene las enzimas (y las bacterias muertas) se añade a un tanque de reacción que ya contiene 200 litros de aceite residual. Luego se añaden 50 litros de agua cada hora hasta que el tanque de reacción contiene aproximadamente 2000 litros de líquido. Las enzimas bacterianas producen los ácidos carboxílicos alifáticos solamente cuando el tanque de reacción contiene más aceite que agua. A medida que las enzimas producen los ácidos carboxílicos alifáticos (en forma de un aceite), el nivel de aceite aumenta. A medida que se

produce el petróleo, el nivel de agua aumenta en el tanque para desplazar el aceite a un rebosadero. El tanque de reacción se repone con más agua a intervalos para mantener la producción de aceite.

El pH del tanque de reacción se mantiene a aproximadamente 6,5 y la temperatura a aproximadamente 15 – 20 °C.

5 La reacción se interrumpe a intervalos para permitir la liberación de los gases disueltos y para re-equilibrar el balance de electrones del sistema.

10 Una vez que se han producido en el tanque de reacción las longitudes de ácidos carboxílicos alifáticos deseadas, el aceite se extrae de la superficie superior arrastrando un colector de grasa o *boom* a través de la superficie superior, desplazando el aceite a una sección más pequeña del tanque de reacción. La viscosidad del aceite da una indicación de la longitud de los ácidos carboxílicos alifáticos. El aceite se bombea a un tanque separado y se elimina cualquier posible agua residual para detener cualquier posible reacción que pueda tener lugar, manteniendo así la longitud de los ácidos carboxílicos alifáticos en el valor deseado. También se añade un agente antimicrobiano antes de filtrar el aceite.

Sistema de tanque 2.

15 Una segunda opción comprende un tanque de mezclado vertical con fondo cónico, recirculación por medio de una bomba, un calentador de inmersión termostatzado y un aspersor en el fondo del tanque para introducir gas dióxido de carbono comprimido (Figura 3). Se añaden al tanque la solución enzimática madre, una pequeña cantidad de aceite para actuar como imprimador, y agua. Opcionalmente se puede añadir también un agente secuestrante de CO₂ tal como trietanolamina o PEG 300. Además, se puede añadir un agente oxidante suave (como hipoclorito de sodio o hidróxido de sodio) para ayudar a iniciar la reacción. El calentador se ajusta a una temperatura de 35 °C y el contenido se mezcla por circulación para formar una emulsión. El dióxido de carbono se introduce a través del aspersor de gas en el fondo del tanque. La conversión de la emulsión aceite-agua en el aceite de ácido carboxílico alifático es seguida de nuevo por la reducción en el nivel de agua en el tanque.

25 Cuando acaba la reacción, finalizan el calentamiento, la circulación y el flujo de gas, y se deja que sedimente el contenido. Cualquier agua libre se descarga por el fondo del tanque y el aceite se bombea a un segundo tanque de sedimentación a través de un filtro de 20 µm. El aceite se deja sedimentar para eliminar el agua residual. Las aguas residuales se recirculan o se pueden destilar para eliminar el material orgánico como un aceite ligero (Figura 3). El aceite puede ser quemado a través de un motor combinado de calor y energía para generar calor y electricidad. Las emisiones de escape del motor pueden entonces reciclarse a través de una unidad depuradora que consiste en cualquier sustancia química secuestrante de dióxido de carbono adecuada, que incluye, pero sin limitarse a ella

30 polietilenglicol 300 (PEG 300).

El aceite puede procesarse adicionalmente por filtración o por eliminación de agua a niveles específicos utilizando ya sea filtros demulsionantes o bien agentes de secado.

35 Los sistemas de tanque 1 y 2 difieren en el tiempo requerido para formar el producto oleoso. El sistema de tanque 1 es una opción de bajo consumo de energía pero requiere tiempos de reacción prolongados, y el sistema de tanque 2 es una técnica más rápida pero requiere un mayor aporte de energía.

El aceite se prueba hasta los límites especificados.

El aceite puede procesarse adicionalmente dependiendo de la aplicación para la que se destina. En algunos casos, el aceite puede mezclarse con otro aceite, por ejemplo para modificar las propiedades/características del otro aceite.

El producto de aceite.

40 Se obtiene un producto de aceite con los siguientes valores típicos:

ANÁLISIS	UNIDADES	VALOR	ESPECIFICACIÓN (SUGERIDA)
Identificación mediante IR	-	Acido carboxílico alifático	Acido carboxílico alifático
Cenizas	m/m	0,03	0,025 – 0,050
Contenido de agua	m/m	2,7	0,05 max.
Punto de inflamación	°C	198	190 min
Viscosidad a 40 °C	cSt	23,092	20 – 25 (50 max)
Indice de viscosidad	-	55	50 min

ES 2 672 874 T3

ANÁLISIS	UNIDADES	VALOR	ESPECIFICACIÓN (SUGERIDA)
Densidad a 20 °C	Kg/l	938	920 – 950
Índice de yodo	mg I/100 g	90,6	85 – 95
Índice de acidez	mg KOH/g	147	140 – 160
Índice de peróxido	meg/kg	2,9	3 max
Poder calorífico superior	MJ/kg	38,12	37 min

Alternativamente, puede obtenerse un producto de aceite con los siguientes valores típicos:

ANÁLISIS	UNIDADES	VALOR	ESPECIFICACIÓN (SUGERIDA)
Identificación mediante IR	-	Acido carboxílico alifático	Acido carboxílico alifático
Genizas	m/m	0,03	0,025 – 0,050
Punto de inflamación	°C	105	100 min
Viscosidad a 40 °C	cSt		50 max
Densidad a 15 °C	Kg/l	0,853	0,85 – 0,882
Índice de yodo	mg I/100 g	90,6	85 – 95
Índice de acidez	mg KOH/g	147	140 – 160
Índice de peróxido	meg/kg	2,9	3 max
Estabilidad de oxidación	H	48+	48 min
Contenido de azufre	m/m	0,08	0,10 max
Poder calorífico superior	MJ/kg	43,42	37 min
Índice de cetano		50	50 min
Potencial de sedimentación	% masa/masa	< 0,2 (típicamente 0,08)	

El aceite consiste en ácidos carboxílicos alifáticos:

- 5 – La huella digital infrarroja (Figura 1) es típica de los ácidos carboxílicos alifáticos.
- El aceite reacciona químicamente como típico de un ácido carboxílico.
- El aceite puede usarse como materia prima corta, media o larga.
- El aceite tiene típicamente una longitud de cadena mayor que 2 y menor que 24.
- El aceite es típicamente monoinsaturado con un índice de yodo de 90 – 95 mg I/100 g.
- 10 – El producto oleoso experimenta las reacciones de un ácido carboxílico como un material de alimentación de cadena corta, media o larga para dar otros productos comercialmente útiles. Estas reacciones incluyen, pero no se limitan a ellas:
 - a. Producción de ésteres por reacción con alcoholes usando lipasas, catalizadores ácidos o catalizadores alcalinos.
 - b. Producción de amidas bien sea a través del éster intermedio o directamente a través de la reacción de Schmidt.
- 15

c. Producción de sales carboxilato con bases que incluyen, pero no exclusivamente, hidróxidos de alcalinos, carbonatos o hidroxicarbonatos.

5 d. Reducción a alcoholes directamente por hidrogenación o a través del intermedio de aldehído utilizando catalizadores que incluyen, pero no exclusivamente, cloruro de N,N-dimetilcloroetilamonio e hidruro de aluminio y litio.

e. Reducción a aldehídos bien sea directamente por hidrogenación o a través de un intermedio tal como el haluro de ácido empleando la reducción de Rosenmund o el tioéster a través de la reducción de Fukuyama.

f. Producción de cloruros de ácido utilizando reactivos que incluyen, pero no exclusivamente, óxido de dicloruro de azufre, cloruro de fósforo (V) y tricloruro de fósforo.

10 g. Descarboxilación del ácido carboxílico o de la sal de ácido bien sea enzimáticamente con descarboxilasas o con cal sodada para generar el hidrocarburo equivalente.

h. Reducción de tamaño por la degradación de Barbier Wieland.

- El aceite se produce directamente y no por la producción previa de biomasa y su posterior procesamiento.

- El aceite no se produce por fermentación.

15 El método de producción de aceite es "conducido" de una manera nueva. El primer paso del proceso es la reducción del dióxido de carbono para producir ácido fórmico. El ácido fórmico es un agente reductor (potencial redox -0,25). El primer paso de la reacción fija el dióxido de carbono pero también genera suficientes equivalentes reductores para conducir la parte siguiente del proceso (construcción de la cadena). El uso de una batería química "in situ" podría conducir otras reacciones redox. El ácido fórmico (reductor) reduce entonces los ácidos carboxílicos disponibles (oxidantes), añadiendo un carbono a una cadena en crecimiento y liberando oxígeno como O₂. Esto esquiva la necesidad de añadir un agente reductor para conducir la reacción, siendo secuestrados en el producto final el carbono y los equivalentes reductores.

20

Etapa 1- $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{HCOOH}$

Etapa 2- $\text{RCOOH} + \text{HCOOH} \rightarrow \text{RCH}_2\text{COOH} + \text{O}_2$

25 Las etapas iniciales de la construcción de la cadena se potencian por la tendencia del ácido fórmico (y la mayor parte de los ácidos carboxílicos de cadena corta) a formar dímeros en solución.

Bibliografia.

- (1) Qiang, L. et al. *Applied Microbiology & Biotechnology* (2008) pp 749-756
- (2) Haas, M.J. et al. *Biodiesel Handbook* (2005) Eds. Knothe, G., Krahl, J. And Gerpen, J.V. AOCS Press, Urbana, IL pp 42-61
- (3) Eliasson, B. et al. *Ind Eng.Chem. Res.* (1998) 37 pp 3350
- (4) Wenzhein, L. *Advances in Carbon Dioxide Conversion and Utilization* (2010) Edit Hu, Y Am Chem Soc, Washington D.C
- (5) Howell, K. *Scientific American* (2009) pp 22
- (6) Liao, J.C. et al. *Nature Biotechnology* 29 (2011) 346-351
- (7) Yin, S et al, (05.01.2012), USA Patent 2012003705
- (8) McCollom, R. et al. *Origins of Life and Evolution in the Biosphere* (1999) 29 153-166
- (9) Yoneyama, H. *Catalysis Today* (1997) 39 169-175
- (10)Reda, T et al. *PNAS* (2008) 105 10654-10658
- (11) Song Yin et al. (2012), US Patent 2012/0003705
- (12) Simpson, S.D (2010), US Patent 2010/0317074A1
- (13) Hickey, R. (2012) US Patent 2012/0003706A1
- (14) Hickey, R (2012) US Patent 2012/0003707A1
- (15) Kohn, R.A and Kim S-W (2012) US Patent 2012/0034664A1
- (16) Worm, P et al. *Microbiology* (2011) 157 286-289
- (17) Molinari, F., Villa, R., Aragozzini, F., Cabella, P., Barbani, M. and Squarcia, F. *J. Chem. Biotechnol.* (1997) 70 294-298
- (18) Fox, M.G.A, Fox, F., Dickinson, M and Ratledge, R. *J. Gen. Microbiol.* (1992) 138 1963-1972
- (19) Tosatto, S.C.E., Toppo, S., Carbonera, D., Giacometti, G.M. and Costantini, P. *Int. J. Hydrogen Energy* (2008) 33 570-578
- (20) Eberz, G., Hogrefe, C., Kortluke, C., Kamienski, A. And Friedrich, B. *J. Bacteriol* (1986) 168 636-641
- (21) Ortrud Ashenbrenner and Peter Styring (2010) *Energy Environmental Science* 3, 1106-1113

REIVINDICACIONES

- 1ª. Un microorganismo que es la cepa *Acetobacter*, que tiene el número de ingreso NCIMB 41808.
- 2ª. El uso del microorganismo según la reivindicación 1ª, para producir ácidos carboxílicos alifáticos.
- 5 3ª. Un método para producir ácidos carboxílicos alifáticos, comprendiendo el método cultivar el microorganismo según la reivindicación 1ª.
- 4ª. El método según la reivindicación 3ª, en el que el microorganismo se cultiva a un pH entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 8,5.
- 10 5ª. El método según la reivindicación 3ª, en el que el microorganismo se cultiva a un pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0.
- 6ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 5ª, en el que el microorganismo se cultiva a una temperatura entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 60 °C.
- 7ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 5ª, en el que el microorganismo se cultiva a una temperatura entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 20 °C.
- 15 8ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 7ª, en el que el dióxido de carbono es la única fuente de carbono.
- 9ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 8ª, en el que el dióxido de carbono se borbotea a través de la solución de cultivo.
- 20 10ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 9ª, en el que la solución de cultivo es una emulsión de aceite en agua.
- 11ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 10ª, en el que la solución de cultivo comprende un agente secuestrante de dióxido de carbono.
- 12ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 11ª, en el que la solución de cultivo comprende un agente oxidante.
- 25 13ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 12ª, en el que el método comprende además eliminar o matar las células del microorganismo después de cultivarlas.
- 14ª. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3ª a 13ª, en el que el método comprende además una o más de las etapas siguientes:
- 30 a) separar los ácidos carboxílicos alifáticos;
- b) filtrar los ácidos carboxílicos alifáticos;
- c) mezclar los ácidos carboxílicos alifáticos con un combustible diferente, preferiblemente un fuelóleo;
- d) modificar químicamente los ácidos carboxílicos, por ejemplo para dar ésteres, alcoholes, cetonas o aldehídos; y
- e) destilar y separar determinadas fracciones de los ácidos carboxílicos alifáticos.
- 35 15ª. Un método para producir un microorganismo, comprendiendo el método modificar o mutar la bacteria que tiene el número de ingreso NCIMB 41808, para producir el microorganismo, en donde el microorganismo puede convertir el dióxido de carbono en ácido fórmico y puede producir ácidos carboxílicos alifáticos que tienen una longitud de cadena de cinco o más átomos de carbono.

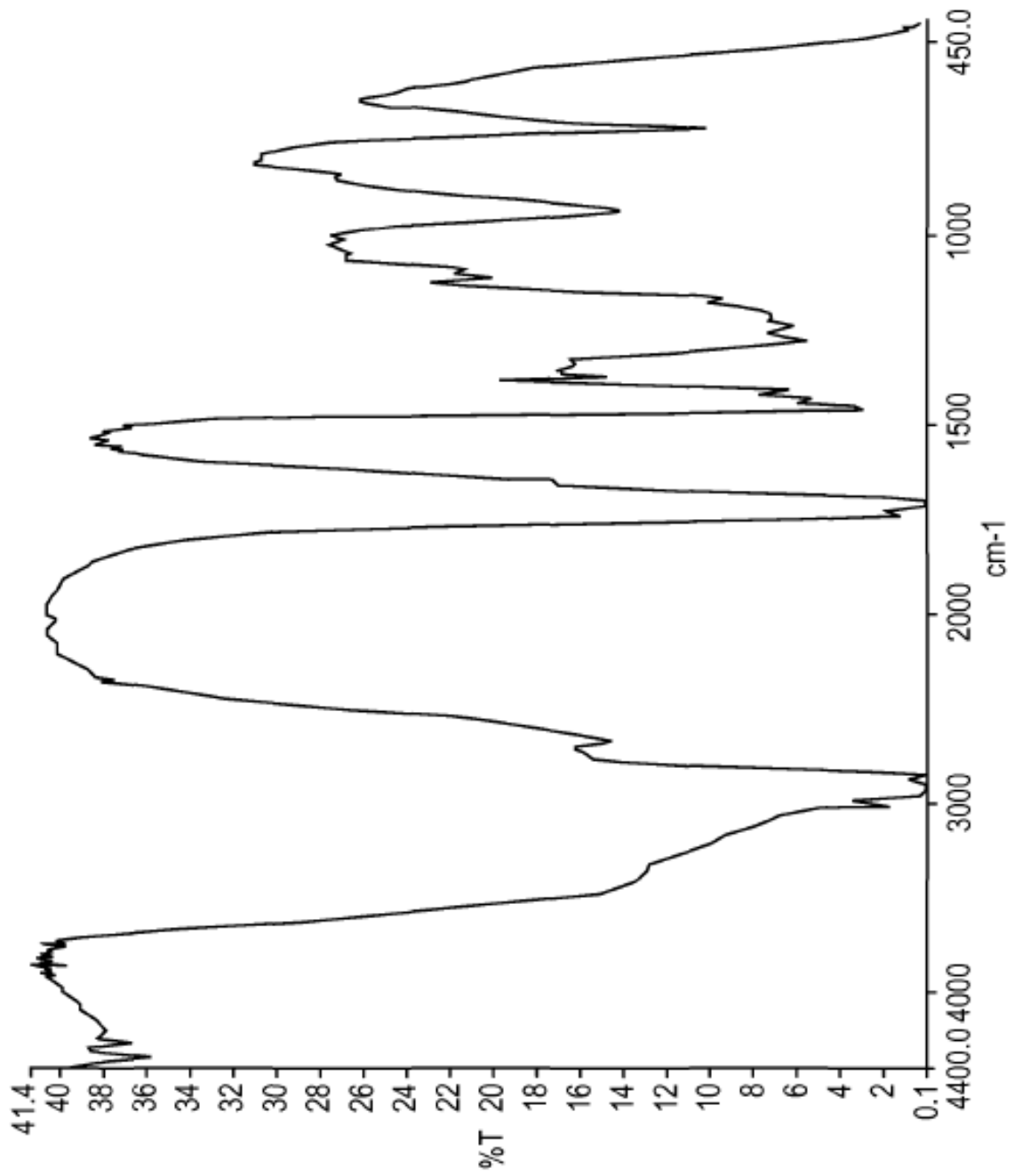


FIG. 1

Figura 2

Sistema de tanque 1

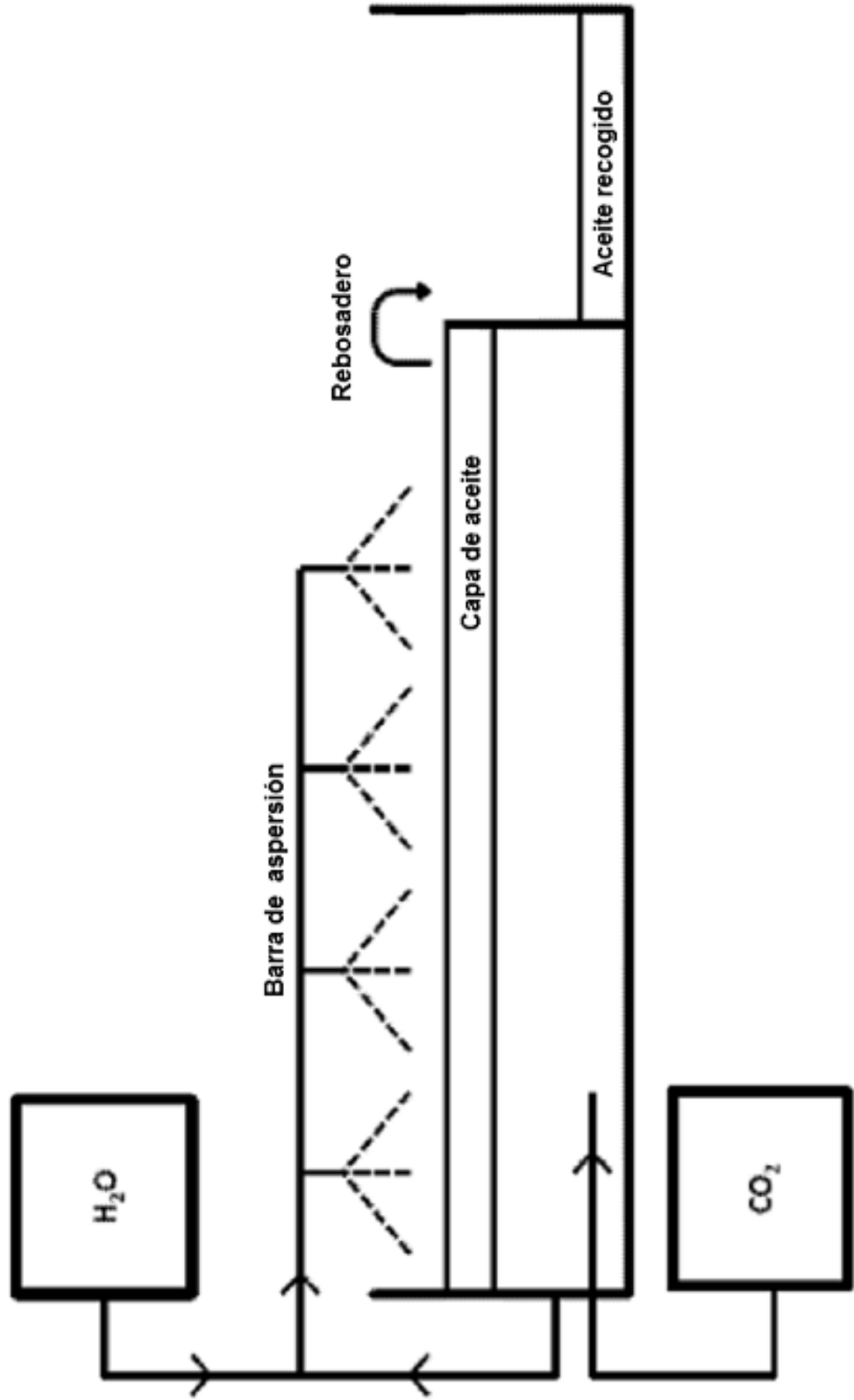


Figura 3

Sistema de tanque 2

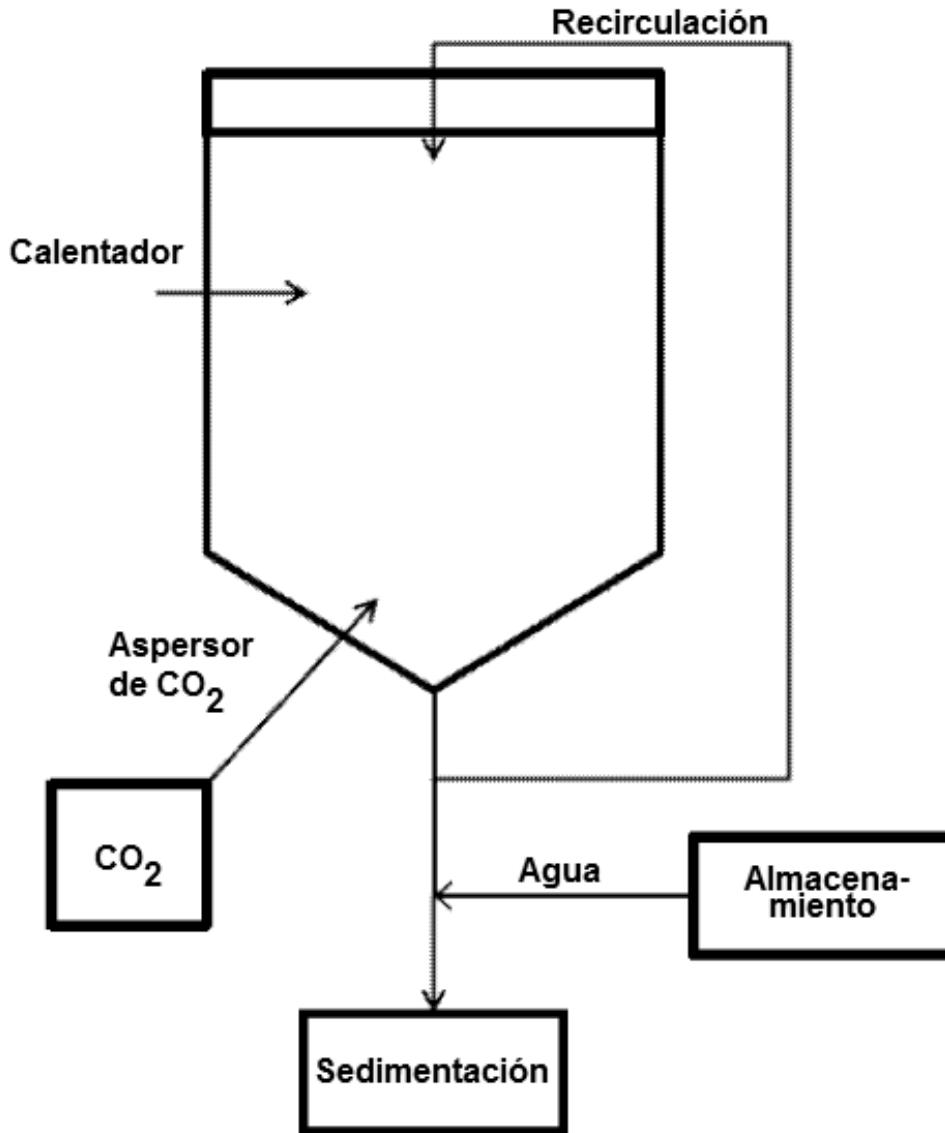


Figura 4

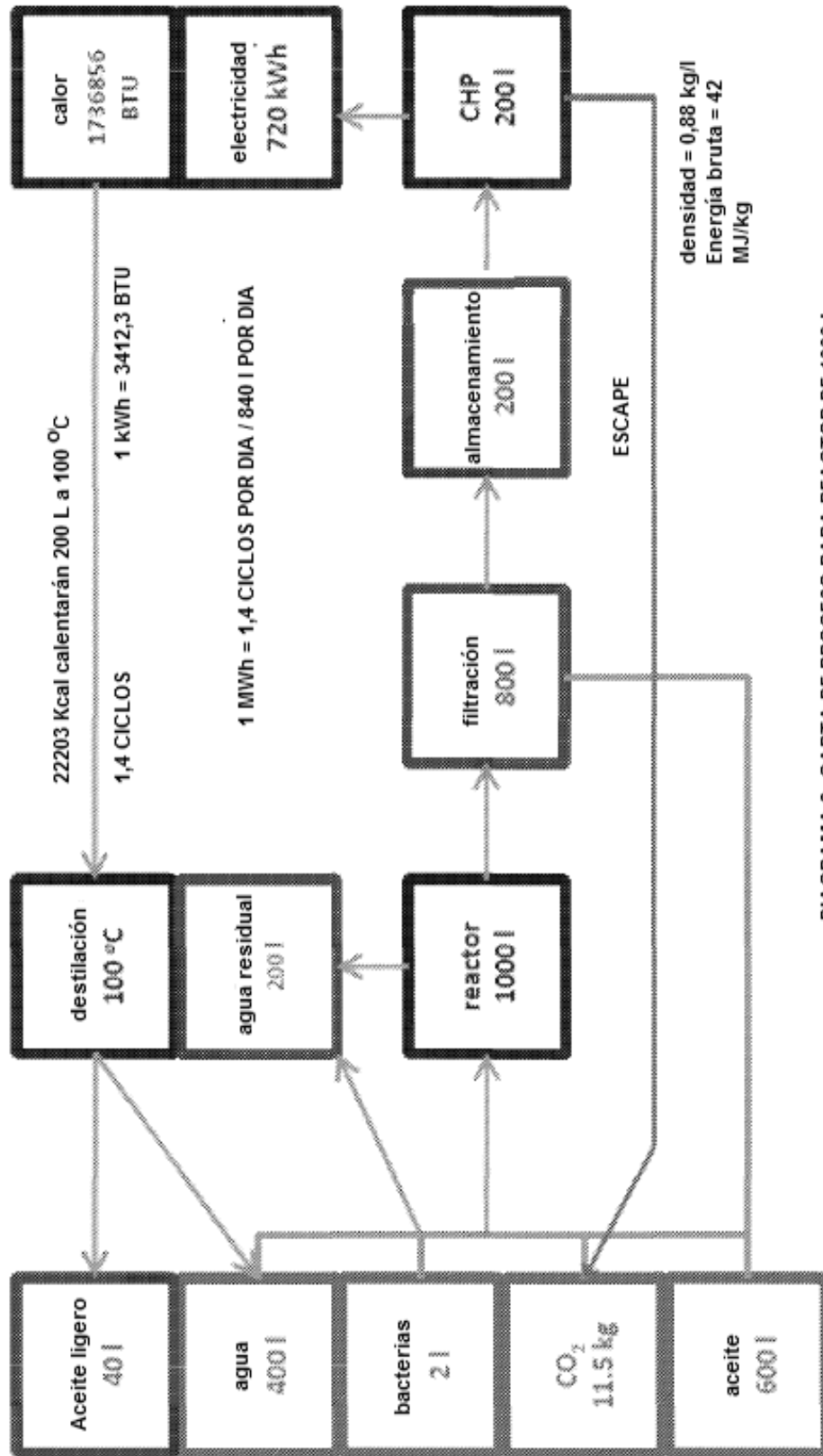


DIAGRAMA 3 - CARTA DE PROCESO PARA REACTOR DE 1000 L