

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 997**

51 Int. Cl.:

C12P 7/04 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2008 PCT/EP2008/010878**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009 WO09083174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2008 E 08868505 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2271764**

54 Título: **Método para la producción enzimática de alcohol graso y/o ácido graso**

30 Prioridad:

27.12.2007 EP 07076132

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

31.10.2017

73 Titular/es:

**WASTE2CHEMICAL KNOWLEDGE B.V. (100.0%)
Bomenweg 2
6703 HD Wageningen**

72 Inventor/es:

**HAMELERS, HUBERTUS, VICTOR, MARIE;
STEINBUSCH, KIRSTEN, JOHANNA, JOSEPHINE y
BUISMAN, CEES, JAN, NICO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 639 997 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la producción enzimática de alcohol graso y/o ácido graso

5 La presente invención se refiere a un método para la producción enzimática de alcohol graso y/o ácidos grasos, a un método para copular covalentemente ácidos carbónicos obtenidos en el método de producción enzimática, y a un método para proporcionar biocombustible en el que se usa el método de producción enzimática.

En vista de los cambios climáticos globales debido a la emisión de dióxido de carbono, los limitados recursos de combustible y el deseo de ser menos dependientes de los productores de petróleo y gas, hay una necesidad incrementada de biocombustible.

10 El documento WO 2007/136762 describe microorganismos genéticamente manipulados que producen ácidos grasos y sus derivados que son útiles como biocombustible y productos químicos especializados.

15 La biomasa puede ser un material de partida para la producción de productos químicos y (bio)combustible. La producción masiva puede tener un efecto negativo sobre la emisión de dióxido de carbono, producción de alimentos, biodiversidad, medioambiente, y similares. En vista de estos posibles efectos negativos una directiva de la UE indica que la biomasa a usar para (bio)combustible se debe producir de una manera medioambientalmente aceptable. El biocombustible se puede producir a partir de biomasa basada en madera o de tipo de madera no apropiada para alimentos o producción de alimentos.

20 Por consiguiente, esta biomasa no competirá con la producción de alimentos. La biomasa de madera o de tipo de madera comprende lignocelulosa que es una combinación de lignina y hemicelulosa. Actualmente la biomasa se puede convertir en hidrocarburos de cadena larga por varios procedimientos. Los ejemplos son gasificación de biomasa en combinación con síntesis de Fisher-Tropsch o por mejora hidrotérmica.

La gasificación de biomasa en combinación con la síntesis de Fisher-Tropsch para la producción de biocombustible requiere desde una perspectiva económica una producción a gran escala dando como resultado altos costes de inversión y complejas y caras logísticas en la provisión de la biomasa a usar.

25 La mejora hidrotérmica usa biomasa húmeda para convertir en biocombustible. La biomasa en agua a altas temperaturas (300-360°C) y a alta presión (100-180 bar) se convierte en crudo. Se retira el oxígeno en la forma de dióxido de carbono proporcionando un producto de biocrudo que comprende un bajo contenido de oxígeno (10-18% en peso) y un relativamente alto valor de combustión (30-35 MJ/kg).

30 Un método biológico comprende una conversión compleja de lignocelulosa por microorganismos en etanol y/o butanol. Estos productos se pueden usar como combustible. Sin embargo, debido a la cadena de carbono corta y la alta polaridad no son apropiados para la adición al biocombustible.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un método para la producción enzimática de alcohol graso y/o ácido graso que se podría usar como tal como valioso producto químico o se podría convertir en biocombustible. Este método hace uso de biomasa que no compite con los alimentos o la producción de alimentos y está en línea con la anteriormente mencionada directiva de la UE.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para la producción enzimática de alcohol graso de C₆-C₁₈ y/o ácido graso de C₈-C₁₈, por elongación de la cadena de carbono, que comprende las etapas de:

i) proporcionar compuestos orgánicos de C₂-C₆;

40 ii) someter los compuestos orgánicos de C₂-C₆ a elongación de la cadena de carbono enzimática en presencia de un dador de electrones, en el que el dador de electrones se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, formiato, monóxido de carbono, compuestos orgánicos de C₂-C₆ con un grado de reducción más alto de 4 y/o mezclas de dadores de electrones; y

iii) separar el alcohol graso de C₆-C₁₈ y/o ácido graso de C₈-C₁₈,

en el que los compuestos orgánicos de C₂-C₆ se proporcionan en la forma de biomasa, biomasa pretratada, biomasa fermentada y/o sus fracciones.

45 La presente invención está basada en la idea de que los compuestos orgánicos de C₂-C₆ se podrían someter a una elongación enzimática de cadena de carbono proporcionando por ello compuestos orgánicos con una cadena de carbono extendida. Esta elongación de cadena de carbono es un procedimiento enzimático que se podría llevar a cabo por microorganismos. Esta elongación enzimática de la cadena de carbono requiere la presencia de un dador de electrones. Los compuestos orgánicos de C₂-C₆ reaccionan enzimáticamente entre sí formando por ello
50 compuestos orgánicos que tienen una cadena de carbono elongada. Se forman compuestos orgánicos valiosos, a saber alcohol graso de C₆-C₁₈ y/o ácido graso de C₈-C₁₈. Sin estar vinculados a ninguna teoría o hipótesis, se considera que la elongación de la cadena de carbono se incrementa por lo menos en dos átomos de carbono o en más átomos de carbono cuando en la etapa de elongación están implicados compuestos orgánicos de C₃-C₆ y/o

tiene lugar una dimerización u oligomerización.

En este momento se advierte que en toda la descripción se denominará ácido graso al ácido graso o a su forma protonada. Por consiguiente, ácido acético y acetato se referirán al mismo tipo de compuesto a menos que se especifique lo contrario. Por consiguiente, los términos ácido acético y acetato se pueden usar indistintamente.

- 5 Los compuestos orgánicos de C₂-C₆ se proporcionan en la forma de biomasa, biomasa pretratada, biomasa fermentada y/o sus fracciones. La elongación enzimática de la cadena de carbono avanza efectivamente y con mejor rendimiento cuando los compuestos orgánicos de C₂-C₆ comprenden ácidos de C₂-C₆ carbonos y/o alcoholes de C₂-C₆ carbonos. Los ejemplos específicos de compuestos de C₂-C₆ son acetato, n-propionato, i-propionato, n-butilato, i-butilato, succinato, n-valerato, i-valerato, n-caproato, i-caproato, n-butanol, e i-butanol. Los mejores resultados (considerando rendimiento y/o velocidad de conversión) se obtienen con acetato, n-propionato, i-propionato, n-butilato, etanol y/o n-butanol.

- 10 Cualquier fuente de biomasa es apropiada para uso en la elongación enzimática de cadena de carbono según la presente invención. Se puede usar biomasa como tal. Sin embargo, se prefiere usar biomasa pretratada en la que el pretratamiento dio como resultado una liberación o una disponibilidad mejorada para la reacción enzimática de los compuestos orgánicos de C₂-C₆ requeridos. Tales pretratamientos pueden comprender fermentación u otra reacción enzimática y un tratamiento de biomasa (tal como madera) con agua supercrítica.

- 15 Además, es posible que el pretratamiento comprenda un tratamiento mecánico o físico. Un tratamiento mecánico comprende molienda, trituración, presión y similares. Los pretratamientos físicos comprenden una exposición al calor, agua, vapor de agua y similares. Por consiguiente, hay una preferencia a usar biomasa pretratada, biomasa fermentada o sus fracciones.

- 20 Como se indica aquí y anteriormente, la elongación enzimática de la cadena de carbono avanza con la presencia requerida de un dador de electrones seleccionado del grupo que comprende hidrógeno, formiato, monóxido de carbono, compuestos orgánicos de C₂-C₆ con un grado de reducción mayor de 4 y/o mezclas de los dadores de electrones. El grado de reducción indica la capacidad de un compuesto para reducir otros compuestos. Se expresa por el número de electrones que están implicados en la semireacción del compuesto con los compuestos en el estado de oxidación de referencia. Los compuestos en el estado de oxidación de referencia son HCO₃⁻, NO₂⁻, SO₄⁻, agua y protones; y tienen por definición un grado de reducción cero.

- 25 El grado de reducción es la cantidad de electrones implicados en esta semireacción de oxidación por átomo de carbono del compuesto (véase McCarty, PL, ed, Energetics of organic matter degradation. Water pollution microbiology, ed. R. Mitchell, Vol. 2. 1972, John Wiley & amp; Sons: New York, 91-118). De este modo, el grado de reducción mayor de 4 quiere decir que por lo menos 4 electrones están implicados en la semireacción del dador de electrones.

- 30 En el caso de compuestos orgánicos de C₂-C₆, el grado de reducción dividido entre cuatro da los moles de O₂ necesarios por átomo de C en el compuesto orgánico necesarios para la oxidación completa a CO₂ y H₂O. El grado de reducción es máximo 8 para el metano.

Los dadores de electrones apropiados son etanol, formiato, monóxido de carbono, metanol, glicerol, lactato, acetato de 1,3-dipropanol, n-propionato, i-propionato, n-butilato, i-butilato, succinato, n-valerato, i-valerato, n-caproato, i-caproato, n-butanol, i-butanol. Se prefieren como dador de electrones hidrógeno, etanol, n-butanol y/o sus mezclas.

- 35 La reacción enzimática se puede llevar a cabo usando enzimas y/o mezclas de enzimas y/o complejos de enzimas. Es práctico el uso de microorganismos en esta reacción enzimática. Estos microorganismos deben ser apropiados para llevar a cabo la elongación de la cadena de carbono en condiciones anaeróbicas reductoras. Las condiciones anaeróbicas reductoras tienen lugar a un potencial redox (medido frente a un electrodo de hidrógeno estándar) inferior a -350 mV, preferentemente inferior a -400 mV, más preferentemente inferior a -450 mV. Un intervalo apropiado para el potencial redox es de -350 a -700 mV, tal como de -400 a -600 mV, tal como de -450 a -550 mV. Se pueden encontrar microorganismos apropiados para la elongación enzimática de la cadena de carbono en condiciones anaeróbicas reductoras en lodo anaeróbico de aguas residuales o en el lodo de un reactor que fermenta acetato y/o etanol (u otros compuestos orgánicos de C₂-C₆). Por consiguiente, los microorganismos pueden provenir de un inóculo de tal lodo o reactor anaeróbico de aguas residuales. Sin embargo, se pueden usar otras fuentes de microorganismos. Por ejemplo, fuentes de bacterias fermentativas, tales como clostridia.

- 40 Cuando se usa un inóculo que comprende varios microorganismos, entonces se prefiere inhibir reacciones enzimáticas paralelas, tales como la formación de metano. Por consiguiente, se prefiere que durante la elongación enzimática de la cadena de carbono la formación de metano está substancialmente inhibida. Según una realización, la formación de metano se suprime o incluso se inhibe llevando a cabo un pretratamiento térmico. Otros pretratamientos comprenden llevar a cabo el método a pH (ácido) relativamente bajo. Someter el inóculo a un tratamiento ácido. Finalmente, otra opción comprende la retirada del sistema de reacción de cualquier dióxido de carbono presente. Un tratamiento alternativo o concomitante comprende la adición de un agente inhibidor de la formación de metano. Un ejemplo de dicho agente inhibidor de la formación de metano es el ácido 2-bromo-etanosulfónico.

El método según la invención proporciona de una manera elegante, partiendo de compuestos orgánicos de C₂-C₆ en la provisión de alcoholes grasos C₆-C₁₈ y/o ácidos grasos de C₈-C₁₈. Son preferidos desde un punto de vista enzimático los alcoholes grasos de C₆-C₈ y los ácidos grasos C₈-C₁₀. Un alcohol graso producido preferido es n-hexanol. Un ácido graso preferido es n-caprilato. Debido a la relativamente grande cadena de carbono, los alcoholes grasos de C₆-C₁₈ formados son ligeramente o insolubles en el medio acuoso en el que se lleva a cabo la elongación enzimática de la cadena de carbono. Por consiguiente, el alcohol graso y/o el ácido graso producidos se pueden separar relativamente fácil del medio acuoso. Los procedimientos de separación apropiados comprenden extracción, precipitación, flotación, sedimentación y/o absorción. Los procedimientos de separación preferidos comprenden extracción con disolvente. Sin embargo, la separación de fases usando, por ejemplo, membranas selectivas es una solución alternativa posible. Obviamente, en vista de unos alcoholes grasos de C₆-C₁₈ producidos en particular y/o ácido graso de C₈-C₁₈, la persona experta puede seleccionar por experimentación rutinaria el procedimiento de separación más apropiado en las circunstancias de residencia.

En general, el pH durante la producción enzimática según la invención se mantiene entre 4-8. Sin embargo, se prefiere mantener el pH dentro del intervalo de 4-6 o más preferentemente dentro del intervalo de 5-6. El pH también se puede elegir dependiendo de las diversas etapas del método para la producción enzimática. Por consiguiente, el pH puede ser neutro durante la elongación enzimática de la cadena de carbono. Un pH apropiado puede estar dentro del intervalo de 6-8, más preferentemente un pH en el intervalo de 6,5-7,5, tal como pH 7. La separación del alcohol graso y/o ácido graso de acuerdo con la invención puede tener lugar sin embargo a pH relativamente ácido, tal como a un pH de 4-7, más preferentemente un pH de 4-6, tal como un pH de 5-6. Obviamente, la persona experta puede seleccionar el pH de separación incluso dependiendo de la separación deseada de los alcoholes grasos de C₆-C₁₈ y/o ácidos grasos de C₈-C₁₈. Incluso el pH se puede seleccionar dependiendo de un ácido graso o alcohol graso más largo o más corto producido.

El método enzimático según la presente invención se puede llevar a cabo de forma continua o discontinua, tal como alimentación discontinua. La producción discontinua tiene la ventaja de tener la opción de ajustar la temperatura y el pH en relación a la etapa del método. Además, se proporciona la posibilidad de llevar a cabo el pretratamiento de la biomasa y/o del inóculo cuando sea necesario.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la copulación covalente de ácidos carbónicos. En este método los ácidos carbónicos se copulan vía una denominada descarboxilación cetónica. Los sujetos de esta descarboxilación cetónica son ácidos grasos de C₈-C₁₈ producidos en la elongación enzimática de la cadena de carbono según la presente invención. Se ha confirmado que en particular los ácidos grasos de C₈-C₁₈, especialmente los ácidos grasos de C₈-C₁₀, tales como n-caprilato, son muy efectivos en esta descarboxilación cetónica.

Se pueden usar varias descarboxilaciones cetónicas conocidas. Un primer ejemplo es el procedimiento descrito en el documento JP 8198796. Este procedimiento comprende una reacción de ácidos carbónicos en fase de vapor en presencia de un catalizador de MgO o CaO. La temperatura de reacción es de alrededor de 250°C cuando se usa el catalizador de MgO o de alrededor de 450°C usando el catalizador de CaO. Otro procedimiento ejemplificado comprende la destilación en seco de la sal de calcio del ácido carbónico. En un procedimiento mejorado se aplica vapor de agua sobrecalentado. Después de la adición de una base se forma ácido carboxílico libre y la sal de calcio precipita y está disponible para reciclar en el proceso. Para una microrevisión véase Renz, M., Ketonization of carboxylic acids by decarboxylation: Mechanism and scope. European Journal of Organic Chemistry, 2005 (6): p. 979-988.

Obviamente, la persona experta puede seleccionar cualquier procedimiento de descarboxilación cetónica apropiado. Es esencial el uso de los ácidos grasos de C₈-C₁₈ formados en la reacción de elongación enzimática de la cadena de carbono según la invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para proporcionar biocombustible. Actualmente, la biomasa, tal como caña de azúcar, se separa por pretratamiento mecánico en una fracción líquida que, por fermentación, proporciona etanol. El etanol se retira del medio acuoso por destilación. La energía para la destilación se obtiene quemando la fracción sólida obtenida durante el tratamiento mecánico de la caña de azúcar. La presente invención proporciona un método mejorado para proporcionar biocombustible que supera el inconveniente de la necesidad de energía para la separación de compuestos orgánicos valiosos, tales como etanol, del medio acuoso de fermentación. La presente invención se basa en la idea de que el etanol producido durante la fermentación como tal o después de la concentración se puede usar como dador de electrones en el procedimiento según la presente invención de elongación enzimática de la cadena de carbono. El alcohol graso de C₆-C₁₈ y/o el alcohol graso de C₈-C₁₈ producido como tal, se pueden usar como biocombustible o después de una elongación de la cadena subsecuente tal como por descarboxilación cetónica. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para proporcionar biocombustible, que comprende las etapas de:

- i) tratar la biomasa para proporcionar una fracción que comprende carbohidrato;
- ii) fermentar la fracción que comprende carbohidrato a etanol;

iii) fermentar la biomasa tratada para proporcionar compuestos orgánicos de C₂-C₆; y

iv) someter los compuestos de C₂-C₆ a elongación de la cadena de carbono según las reivindicaciones 1-12 usando por lo menos el etanol de la etapa ii) como dador de electrones orgánico.

5 Finalmente, la presente invención describe el uso de ácidos grasos de C₈-C₁₈, en particular ácido caprílico en la producción de biocombustible.

Los ejemplos siguientes se dan como una ilustración de los diversos métodos según la invención, pero no se pretende que limiten los métodos según la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

10 Se obtuvo un inóculo de lodo anaeróbico de aguas residuales. Los viales de fermentación con un volumen de 125 ml se llenaron con 37,5 ml de medio. El medio por litro:

	Cantidad o volumen
Substrato	50 mM
(NH ₄)H ₂ PO ₄	3.600 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	500 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	200 mg
KCl	500 mg
Metales en trazas ¹	1 ml
Vitaminas B ²	1 ml

¹ disolución de trazas de metales de Pfenning en 100 ml

² disolución de vitaminas B en 100 ml

	Peso en mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	100,0
MnCl ₂ .4H ₂ O	30,0
H ₃ BO ₃	300,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	200,0
CuCl ₂ .H ₂ O	10,0
NiCl ₂ .6H ₂ O	20,0
Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	30,0
FeCl ₂ .4H ₂ O	1.500,0
AlCl ₂ .6H ₂ O	45,0
Na ₂ SeO ₃	10,0

Vitaminas B	Peso en mg
Biotina	106
Ácido fólico	5
Piridoxal-HCl	2,5
Ácido lipoico	270

Riboflavina	13
Tiamina-HCl	13
Ca-D-pantotenato	414
Cianocobalamina	13
Ácido p-aminobenzoico	11
Ácido nicotínico	15

5 El medio se preparó como se describe por Phillips, J. R., et al., Biological production of ethanol from coal synthesis gas-medium development studies. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1993. 39: p.. 559-571. Se añade acetato 50 mM y adicionalmente ácido 2-bromo-etanosulfónico. El pH del medio se ajustó a 5,5 y se cerraron los viales de fermentación usando un tapón de caucho. La fase gaseosa en las botellas de fermentación consistía en nitrógeno. Un inóculo que proviene de un reactor anaeróbico se usa para la conversión de acetato y etanol. Los viales se incuban a 30°C y se agitan a 200 rpm. Durante un periodo de tiempo de 99 días se midió el pH y se ajustó a un pH de 5,35-5,65 usando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Ejemplo 2

10 Se han usado las mismas condiciones que en el ejemplo 1, pero en lugar de acetato 50 mM se añadió etanol 50 mM al medio. Además, la fase gaseosa comprendía una mezcla de nitrógeno e hidrógeno a una presión parcial de hidrógeno de 1,5 bar.

Ejemplo 3

En comparación con el ejemplo 2, se añadió al medio acetato 50 mM y etanol 50 mM.

15 Los resultados de los ejemplos 1, 2 y 3 se resumen en la siguiente tabla

Tabla: concentración media del sustrato consumido (valor negativo) y productos de fermentación (valores positivos) después de 99 días; cada experimento se llevó a cabo por triplicado

Condiciones del sistema	Sustrato		
	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Productos (mg/ml)			
Etanol	13,3 ± 2,6	-1.879 ± 30	-1.458 ± 255
Propanol	0,4 ± 0,9	5,7 ± 2,9	7,7 ± 0,4
n-butanol	23,9 ± 3,9	122 ± 59	32,0 ± 8,3
n-hexanol	6,8 ± 1,8	22,3 ± 6,6	84,1 ± 22,1
Acetato	-1.841 ± 152	-2.635 ± 31	-14,9 ± 12,7
Propionato	31,1 ± 4,6	51,1 ± 5,8	18,7 ± 9,9
i-butilato	61,7 ± 39,7	596 ± 45	33,7 ± 23,1
n-butilato	415,6 ± 21,7	1.485 ± 92,3	164 ± 77,2
i-valerato	29,1 ± 2,0	30,7 ± 6,5	26,0 ± 3,2
n-valerato	12,8 ± 1,1	13,0 ± 1,3	5,5 ± 0,5
n-caproato	323 ± 25	667,5 ± 37,1	159 ± 9,3
n-caprilato	512 ± 111	649,2 ± 93,5	605 ± 46
C recuperación (%)	110,3 ± 6,9	105,1 ± 8,6	96,4 ± 9,0
E recuperación (%)	105,0 ± 6,6	102,3 ± 7,8	92,4 ± 17,4

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción enzimática de alcohol graso de C₆-C₁₈ y/o ácido graso de C₈-C₁₈, por elongación de la cadena de carbono, que comprende las etapas de:
- 5 i) proporcionar compuestos orgánicos de C₂-C₆;
- ii) someter los compuestos orgánicos de C₂-C₆ a elongación enzimática de la cadena de carbono en presencia de un dador de electrones; en el que el dador de electrones se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, formiato, monóxido de carbono, compuestos orgánicos de C₁-C₆ con un grado de reducción mayor de 4 y/o mezclas de los dadores de electrones; y
- 10 iii) separar el alcohol graso de C₆-C₁₈ y/o el ácido graso de C₈-C₁₈ formados,
- en el que los compuestos orgánicos de C₂-C₆ se proporcionan en la forma de biomasa, biomasa pretratada, biomasa fermentada y/o sus fracciones.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que los compuestos orgánicos de C₂-C₆ comprenden ácidos orgánicos de C₂-C₆ carbonos y/o alcoholes de C₂-C₆, en el que preferentemente los compuestos orgánicos de C₂-C₆ comprenden acetato, n-propionato, i-propionato, n-butilato, i-butilato, succinato, n-valerato, i-valerato, n-caproato, i-caproato, n-butanol, e i-butanol, en el que preferentemente los compuestos orgánicos de C₂-C₆ comprenden acetato, n-propionato, i-propionato, n-butilato, etanol y/o n-butanol.
- 15 3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que el dador de electrones es hidrógeno, etanol, n-butanol y/o sus mezclas.
- 20 4. Un método según las reivindicaciones 1-3, en el que la elongación enzimática de la cadena de carbono se lleva a cabo por microorganismos en condiciones anaeróbicas reductoras a un potencial redox menor de -350 mV, preferentemente menor de -400 mV, más preferentemente menor de -450 mV, en el que preferentemente los microorganismos provienen de un inóculo de lodo anaeróbico de aguas residuales, en el que preferentemente los microorganismos son una bacteria fermentativa, tal como Clostridia.
- 25 5. Un método según las reivindicaciones 1-4, en el que el alcohol graso de C₆-C₁₈ producido es alcohol graso de C₆-C₈, preferentemente n-hexanol, y/o el ácido graso de C₈-C₁₈ producido es ácido graso de C₈-C₁₀, preferentemente n-caprilato.
6. Un método según las reivindicaciones 1-5, en el que el alcohol graso de C₆-C₁₈ y/o el ácido graso de C₈-C₁₈ se separan por extracción, precipitación, flotación, sedimentación y/o absorción.
- 30 7. Un método según las reivindicaciones 4-6, en el que durante la elongación enzimática de la cadena de carbono la formación de metano está substancialmente inhibida.
8. Un método según la reivindicación 7, que comprende un pretratamiento térmico.
9. Un método según la reivindicación 7 u 8, que comprende la adición de un agente de inhibición de la formación de metano, tal como ácido 2-bromo-etanosulfónico.
- 35 10. Un método según las reivindicaciones 1-9, en el que el pH se mantiene entre 4-8, preferentemente 4-6, tal como 5-6.
11. Un método según la reivindicación 10, en el que la separación del alcohol graso de C₆-C₈ y/o ácido graso de C₈-C₁₈ se lleva a cabo a pH 4-7, preferentemente a pH 4-6, tal como pH 5-6.
- 40 12. El método según las reivindicaciones 10 u 11, en el que la elongación enzimática de la cadena de carbono se lleva a cabo a pH 6-8, preferentemente a pH 6,5-7,5, tal como pH 7.
13. El método para copular covalentemente ácidos carbónicos, que comprende las etapas de:
- i) proporcionar ácidos grasos de C₈-C₁₈ con el método según las reivindicaciones 1-8; y
- ii) someter los ácidos grasos de C₈-C₁₈ a descarboxilación cetónica.
14. Un método para proporcionar biocombustible, que comprende las etapas de:
- 45 i) tratar biomasa para proporcionar una fracción que comprende carbohidrato;
- ii) fermentar la fracción que comprende carbohidrato a etanol;
- iii) fermentar la biomasa tratada para proporcionar compuestos orgánicos de C₂-C₆; y

iv) someter los compuestos de C₂-C₆ a una elongación de la cadena de carbono según las reivindicaciones 1-12 usando por lo menos el etanol de la etapa ii) como dador de electrones orgánico,

que comprende preferentemente la etapa de someter el producto de la etapa iv) al método según la reivindicación 13.