

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 484**

51 Int. Cl.:

C10L 1/02 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2011 PCT/IB2011/052652**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11158215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11736165 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2582776**

54 Título: **Método para la cría de ascidias**

30 Prioridad:

17.06.2010 GB 201010176

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

19.02.2020

73 Titular/es:

**BERGEN TEKNOLOGIOVERFØRING AS (100.0%)
Thormøhlensgate 51
5006 Bergen, NO**

72 Inventor/es:

**TROEDSSON, CHRISTOFER;
THOMPSON, ERIC;
SCHANDER, CHRISTOFFER;
BOUQUET, JEAN-MARIE;
MAGNESEN, THOROLF y
LI, JIEBING**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 743 484 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 cría de ascidias

5 La presente invención se refiere a un método de cría de ascidias

Antecedentes de la invención

10 La depleción de suministros de combustibles fósiles globales y su efecto sobre los sistemas climáticos globales ha impulsado un esfuerzo para encontrar fuentes de energía alternativas, en particular, fuentes de energía renovables. Una alternativa prometedora para el combustible fósil es el etanol ya que se puede producir a partir de fuentes renovables y tiene emisiones inferiores que el combustible fósil. Actualmente, las fuentes de biomasa para la producción de etanol derivan de plantas, las fuentes más importantes incluyendo cultivos alimentarios terrestres tales como la caña de azúcar y el maíz. Los cultivos no alimentarios tales como la madera y Miscanthus se usan también como fuentes de biomasa para la producción de etanol. Otra alternativa al combustible fósil es el biodiésel que también se puede producir a partir de fuentes de energía renovables. En la actualidad, las materias primas más importantes para la producción de biodiésel incluyen aceite de palma y coco. Sin embargo, un problema más importante con las fuentes mencionadas de biomasa/materia prima es que compiten directamente por la tierra cultivable para la producción alimentaria. Por lo tanto, al aumentar la población global, el uso de dichas fuentes terrestres para la producción de biocombustible podría conducir a la escasez de alimentos y aumentos en los precios de los alimentos. Los desechos de los cultivos alimentarios tales como tallos de trigo y maíz se usan también para la producción de etanol y, aunque, esta fuente de biomasa no sufre el problema de competir directamente con el suministro de alimentos, es insuficiente por sí misma para satisfacer la demanda global. En los últimos años, se ha dirigido la atención a la producción de biocombustibles tales como el etanol a partir de las algas. Sin embargo, se han encontrado dificultades en los procesos de extracción y todavía tiene que ocurrir la realización comercial. Además, se requieren biorreactores grandes para hacer cantidades suficientes de algas y, para aumentar la eficacia, la investigación está focalizada actualmente en organismos modificados genéticamente que añade restricciones extra en el proceso de manipulación.

20 30 Las fuentes de energía renovables necesitan cumplir requisitos que incluyen: (i) la capacidad de producirse en cantidades grandes; (ii) ser no competitivos con el suministro de alimentos; y (iii) tener un impacto medioambiental mínimo. Existe una fuerte necesidad para una fuente de energía renovable que aborde los problemas anteriores y satisfaga los requisitos anteriores.

35 40 Los tunicados son un grupo de filtradores submarinos encontrados globalmente en la mayoría de hábitats marinos. Las ascidias son la clase de tunicados conocida más comúnmente. Su uso más común es como un organismo modelo en la investigación de la biología en desarrollo evolutiva. Su desarrollo embrionario es simple, rápido y fácilmente manipulado y por lo tanto constituyen buenos modelos para estudiar los procesos de desarrollo fundamental de los cordados. Los tunicados son los únicos animales que sintetizan la celulosa. Se conoce la extracción de celulosa de las ascidias y el uso de la misma en la producción de materiales de construcción (documentos KR2000-0000303 y JP09-157304). No ha habido informes ni estudios sobre el desarrollo de tunicados para producir biocombustibles tales como alcoholes y biodiésel hasta el momento.

45 El documento US 2003/0111020 divulga un método para producir un fármaco marino que implica la colocación de una pluralidad de sustratos similares en el agua del mar, cultivar un organismo sésil marino en la pluralidad de sustratos, cosechar el organismo cultivado y extraer el fármaco del organismo cosechado.

Estado de la invención

50 Un aspecto de la invención se refiere a un método de cría de ascidias que comprende las etapas de:

- (a) colonizar superficies de una estructura submarina con ascidias; y
- (b) cosechar dichas ascidias de dicha estructura,

55 en donde dicha estructura comprende una pluralidad de miembros alargados y define una región submarina tridimensional dispuesta para soportar la colonización de tunicados y, además, en donde la pluralidad de miembros alargados comprende al menos un miembro de soporte alargado y una pluralidad de miembros de colonización, en donde cada miembro de colonización está acoplado a dicho miembro de soporte y comprende al menos una superficie de colonización plana y horizontal que es uniforme y sin interrupción y en la forma de un plato o disco.

60 65 La divulgación se refiere a una nueva fuente de biomasa para la producción de los biocombustibles que son alcoholes y biodiésel. Los tunicados son oportunistas y tienen un potencial de crecimiento muy elevado y por lo tanto pueden proporcionar potencialmente grandes cantidades de biomasa; no requieren un terreno cultivable para el crecimiento y, por tanto, no compiten con la producción de cultivos alimentarios terrestres; y su cría tiene efectos secundarios positivos tales como la mejora de la calidad del agua, particularmente en áreas sometidas a niveles indeseables de

eutroficación debida a la escorrentía terrestre. Por tanto, esta nueva fuente de biomasa satisface los requisitos mencionados anteriormente para una fuente de energía renovable.

Figuras

5 La figura 1 es un espectro de cromatograma de gases que muestra la composición de ácidos grasos de una muestra de *C. intestinalis*.

10 La figura 2 es un análisis de RMN H de lípidos extraídos de una muestra de *C. intestinalis*.

La figura 3 es una realización de un miembro alargado que es una cuerda unida a un sistema de palangre de superficie, que usa una boya y un peso para mantener la cuerda vertical en la columna de agua.

15 La figura 4 es otra realización de un miembro alargado que comprende tubos de PVC de plástico huecos unidos a un sistema de palangre de superficie, que usa una boya y un peso para mantener la cuerda vertical en la columna de agua. Esta realización no forma parte de la invención.

20 La figura 5 es otra realización de un miembro alargado que comprende discos de PVC unidos a un sistema de palangre de superficie, que usa una boya y un peso para mantener la cuerda vertical en la columna de agua.

La figura 6(i) es una fotografía de la celulosa obtenida de una muestra de *C. intestinalis* como se describe en los ejemplos, bajo microscopía (x 40).

25 La figura 6(ii) es una fotografía de la celulosa obtenida de una muestra de madera como se describe en los ejemplos, bajo microscopía (x 40).

La figura 7 ilustra una cantidad de disposiciones alternativas de aparatos de colonización. Las disposiciones mostradas en las figuras 7C y 7D no forman parte de la invención.

30 La figura 8 es un gráfico de biomasa en kg por metro² como función de la profundidad (m) de un tunicado cultivado de acuerdo con el método de la presente invención (platos) en comparación con un método en el que las superficies de colonización son cilindros.

35 La figura 9 es un gráfico de biomasa en kg por metro² como función de la profundidad (m) de un tunicado cosechado de las cuerdas de distintos colores.

Descripción detallada

40 En el presente documento se divulga el uso de un tunicado o extracto obtenido de un tunicado para la producción de uno o más biocombustibles seleccionados de un alcohol y biodiésel.

Los tunicados

45 Los tunicados se encuentran globalmente en la mayoría de hábitats marinos. Los tunicados son los únicos animales que sintetizan la celulosa. La celulosa representa una proporción significativa de la biomasa de los animales^{1,2}. Los tunicados tienen un elevado potencial de crecimiento, una característica que puede contribuir a grandes floraciones durante el año y dar como resultado unas fuentes de celulosa significativas. Esto les hace particularmente adecuadas como fuente de energía renovable.

50 Dentro del subfilo Tunicata, hay tres clases: ascidias, taliáceos y larváceos³. En la invención, el tunicado se selecciona de las ascidias, taliáceos y larváceos. Preferentemente, el tunicado es una ascidia. Las ascidias se conocen también comúnmente como jeringas de mar. Muchas especies de ascidias son oportunistas con un estadio larvario pelágico libre y atravesarán una metamorfosis cuando se asienten en una nueva superficie en el entorno marino, por ejemplo, la superficie del casco de un barco. Debido a su comportamiento oportunista son a menudo los primeros animales que colonizan las superficies de una nueva estructura sumergida. Son por lo tanto fáciles de cosechar.

55 Hay muchas especies de ascidias, por ejemplo, *Aplidium glabrum*, *Ascidia sydneiensis*, *Ascidia mentula*, *Asciidiella aspersa*, *Botrylloides violaceus*, *Botryllus schlosseri*, *Ciona savignyi*, *Didemnum candidum*, *Didemnum vexillum*, *Diplosoma listerianum*, *Eusynstyela tincta*, *Herdmania pallida*, *Lissoclinum fragile*, *Microcosmus exasperatus*, *Microcosmus squamiger*, *Molgula manhattensis*, *Perophora japonica*, *Phallusia nigra*, *Styela canopus*, *Styela clava*, *Trididemnum solidus* y *Ciona intestinalis*. Entre las ascidias, *C. intestinalis* es la especie más dominante en las aguas escandinavas. Es también la especie más estudiada, en primer lugar debido a su uso como un organismo modelo en la investigación de la biología en desarrollo evolutiva⁴. *C. intestinalis* es hermafrodita, desovando libremente en la columna de agua donde tiene lugar la fertilización. Las larvas nadan libremente, no se alimentan y se adherirán a cualquier superficie adecuada y experimentarán la metamorfosis dentro de 1-5 días dependiendo de la temperatura^{5,6}. La celulosa se produce en la túnica de los estadios tanto larvario como adulto. En las larvas, sirve en primer lugar

como una función protectora pero también está implicada en el control del orden de los eventos durante la metamorfosis conduciendo a la forma juvenil y adulta^{7,8}. En los adultos, la celulosa es un componente estructural de la túnica que rodea el animal entero y crece en colaboración con el resto del cuerpo. Está también presente en el cordón de la túnica que conecta la túnica y el manto⁹. A lo largo de las costas escandinavas, el asentamiento larvario ocurre continuamente a lo largo del año. En una realización preferida de la presente invención el tunicado es *C. intestinalis*.

Como se usa en el presente documento, un tunicado se refiere al conjunto o a una parte del cuerpo de un tunicado.

Como se usa en el presente documento, un extracto obtenido de un tunicado se refiere a un material rico en un tipo de sustancia obtenida de dicho tunicado. Los extractos obtenidos de un tunicado incluyen el material obtenido mediante el procesamiento de un tunicado que es rico en: uno o más monosacáridos; un polisacárido, por ejemplo, la celulosa; y/o lípidos/ácidos grasos.

En la divulgación, un tunicado o el extracto obtenido de un tunicado se usa como biomasa o materia prima para la producción de los biocombustibles descritos en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "un tunicado" pueden reemplazarse por "uno o más tunicados" o "tunicados".

Biocombustible

Como se usa en el presente documento, un biocombustible es un biocombustible seleccionado de un alcohol y biodiésel, preferentemente seleccionado de etanol y ésteres alquílicos de ácidos grasos.

Alcohol

En el presente documento se divulga el uso de un tunicado o extracto obtenido de un tunicado para la producción de un alcohol. Preferentemente, el alcohol es un alcohol C₁-C₄, es decir, metanol, etanol, propanol o butanol. Más preferentemente el alcohol es etanol.

Los presentes estudios han encontrado un rendimiento del 8,8 % en peso de azúcares C₆ (6,7 % en peso de celulosa, 2,1 % en peso de manosa y galactosa) y 0,4 % en peso de azúcares C₅ para el tunicado *C. intestinalis*. La celulosa se puede convertir en etanol por hidrólisis enzimática o ácida, seguido por la fermentación^{10 a15}. Los presentes estudios han encontrado que la celulosa derivada de *C. intestinalis* es más cristalina y más pequeña en tamaño molecular que la celulosa de madera. Por lo tanto, esta celulosa se hidroliza más fácilmente por la hidrólisis ácida o enzimática a glucosa para la fermentación a etanol. Como resultado, la producción de etanol a partir de esta celulosa será más simple y más económica que a partir de la madera.

El potencial para la producción de etanol a partir de esta especie se puede estimar de la siguiente manera. A partir de la bibliografía, se sabe que *C. intestinalis* de 100 mm de largo tiene un peso en seco de 0,6 g¹⁶. *C. intestinalis* se encuentra a menudo en densidades que alcanzan a 3000 individuos por m² de suelo oceánico. Esta cantidad de ascidias pesará 1,8 kg/m² (3.000 individuos/m² x 0,0006 kg/individuo = 1,8 kg de ascidias/m²). A un rendimiento del 8,8 % en peso de azúcares C₆, 1,8 kg de ascidias producirán 0,16 kg de azúcares C₆ (0,088 x 1,8 kg = 0,16 kg de azúcares C₆). Asumiendo un rendimiento de 0,64 l de etanol por kg de azúcar C₆, 0,16 kg de azúcares C₆ producirán 0,10 l de etanol (0,16 x 0,64 = 0,10 l de etanol). Esto da un rendimiento de etanol de 0,10 l/m² o 1.000 l/hectárea de suelo oceánico.

El cálculo anterior está basado en una cosecha. Como es posible cosechar *C. intestinalis* al menos dos veces por año¹⁷, hay potencial para un rendimiento anual de etanol de al menos 2.000 l/hectárea de suelo oceánico. Este cálculo se realiza para la cría bidimensional, por ejemplo, en el suelo oceánico. Como las ascidias se pueden criar en tres dimensiones en la columna de agua del océano, el rendimiento potencial de etanol por hectárea de suelo oceánico/superficie oceánica es mucho mayor. Las ascidias no están restringidas a la zona fótica y por lo tanto se pueden obtener tasas de crecimiento elevadas en profundidades tan bajas como de 60 o 70 m. Tomando una situación en la que las ascidias se cultivan en bastones sumergidos que tienen una longitud de 20 m y un diámetro de 0,4 m (dando un área superficial de 25,12 m² por bastón) y que están separados de 1 m a lo largo de 1 hectárea (es decir, 10.000 bastones). Esto proporciona 251.200 m² de área superficial para el crecimiento de ascidias por hectárea de superficie oceánica. De esta manera, basándose en los cálculos anteriores, a su vez, podría producir una producción anual de aproximadamente 50.900 l de etanol por hectárea de superficie oceánica. Esto significa que 1 hectárea de superficie oceánica tiene el potencial de proporcionar al menos aproximadamente 50.900 l de etanol anualmente. Además de los azúcares C₆, un rendimiento del 0,4 % en peso de azúcares C₅ es posible a partir de la ascidia *C. intestinalis*. Los azúcares C₅ se pueden fermentar a etanol, añadiendo 4,5 % más etanol al obtenido de los azúcares C₆ (es decir, basándose en el modelo anterior, dando una producción anual de 1,045 x 50.900 = 53.190 l de etanol).

Los presentes estudios han demostrado que el rendimiento puede ser mucho mayor que la estimación anterior. Los presentes estudios han demostrado que *C. intestinalis* puede cultivarse hasta aproximadamente 31 g (1,37 g de peso

en seco) después de 6 meses de crecimiento. Además, en el presente documento se describe el uso de miembros alargados que soportan una pluralidad de superficies de colonización en forma de platos, se pueden alcanzar densidades de 9690 individuos por m². En un modelo de cría tridimensional, asumiendo 3 platos por metro de longitud en una cuerda de 20 metros y un área superficial de plato de 0,2 m², habrá un área superficial de 12 m² por miembro alargado en el mar, o 120.000 m² por hectárea si los miembros alargados están separados de 1 m. Asumiendo 2 cosechas por año, el rendimiento anual de etanol por hectárea será de aproximadamente 180.000 l usando el mismo cálculo que antes (9690 individuos/m² x 0,00137 kg x 0,088 de azúcar C6 x 0,64 l de etanol por kg de azúcar x 120.000 m² x 2 cosechas por año = 180.000 l de etanol), o 188.000 l anualmente incluyendo la contribución de azúcares C5.

El rendimiento potencial de etanol de los tunicados puede compararse con los rendimientos anuales de cultivos usados tradicionalmente como biomasa para la producción de etanol en la tabla siguiente:

Tabla 1 Rendimiento anual de etanol de varios cultivos¹⁸

Cultivo	Rendimiento anual (l/hectárea)
Miscanthus	7.300
Pasto varilla	3.100-7.600
Álamo	3.700-6.000
Caña de azúcar	6.800-8.000
Sorgo dulce	7.000
Maíz	3.100-4.100

Por tanto, la cantidad de etanol por hectárea de superficie oceánica producida a partir de tunicados tiene el potencial de exceder enormemente la producida por los cultivos terrestres por hectárea de terreno cultivable y por un orden de magnitud en algunos casos.

En el presente documento se divulga el uso de un tunicado como biomasa para la producción de un alcohol. En el presente documento se divulga un método para producir un alcohol a partir de un tunicado en donde dicho método comprende:

- (i) someter dicho tunicado de hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos; y
- (ii) fermentar dichos uno o más monosacáridos para formar un alcohol.

En este aspecto de la divulgación, el tunicado mismo se somete a hidrólisis enzimática o ácida y no es necesaria ninguna extracción de polisacáridos ni monosacáridos del tunicado.

El tunicado puede estar en la forma del conjunto del cuerpo del tunicado o puede estar en la forma de parte del cuerpo de un tunicado, preferentemente la túnica que se ha aislado del resto del cuerpo del tunicado. El tunicado puede, por ejemplo, cosecharse recientemente o descongelarse de un suministro congelado. Preferentemente, el tunicado se lava para eliminar las sales marinas. Preferentemente, este lavado se realiza en un tunicado húmedo, es decir, un tunicado que no se ha sometido a secado y preferentemente el lavado se realiza con agua desionizada o dulce. Esto reduce ventajosamente el contenido de ceniza del material de tunicado resultante.

Antes de someter el tunicado a hidrólisis enzimática o ácida, el tunicado se seca preferentemente. Preferentemente, la divulgación se refiere a un método para producir un alcohol a partir de un tunicado en donde dicho método comprende:

- (i) secar dicho tunicado;
- (ii) someter dicho tunicado seco a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos; y
- (iii) fermentar dichos uno o más monosacáridos para formar un alcohol.

El secado puede llevarse a cabo mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, el tunicado se seca hasta un contenido de sequedad (también denominado en el presente documento como sequedad) de más del 50 %, más preferentemente, hasta más del 70 %, más preferentemente, hasta más del 80 %, más preferentemente, hasta más del 85 % e incluso más preferentemente hasta más del 90 %. Como se utiliza en el presente documento, el contenido de sequedad es una medición del peso en seco del material de tunicado. Se calcula después de secar el material de tunicado mediante calentamiento en horno a 105 °C durante la noche (en una escala en gramos de la muestra) o por calentamiento por infrarrojos a 105 °C hasta que se alcanza un peso constante (en una escala de 300 mg de la muestra) y es el porcentaje en peso del material seco resultante basándose en el peso del material de

5 tunicado húmedo antes del secado. El tunicado puede secarse presionándolo para eliminar parte del agua, extendiéndolo sobre un suelo caliente para secarlo hasta, por ejemplo, aproximadamente un 39 % de sequedad. Después, el tunicado puede transferirse a un horno, por ejemplo, calentado a 130 - 150 °C, donde se seca hasta, por ejemplo, aproximadamente un 89 % de sequedad. Como alternativa, el tunicado puede secarse por liofilización o secarse por secado por pulverización, por ejemplo, a temperaturas de más de 100°C en una escala de tiempo en segundos. El uso de tunicado seco tiene la ventaja de minimizar los efectos inhibitorios sobre cualquier hidrólisis enzimática posterior. En una realización, el material de tunicado se puede romper mecánicamente, por medio de trituración, por ejemplo.

10 En este aspecto de la divulgación, el material de tunicado seco puede someterse a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos. El hidrolizado puede someterse después a fermentación para producir un alcohol.

15 Además de la celulosa, los tunicados comprenden también azúcares C₆ tales como la manosa y la galactosa y pueden comprender uno o más azúcares C₅ tales como la xilosa y la arabinosa. El tunicado seco comprende polisacáridos tales como la celulosa y otros polisacáridos o glicoproteína compuesta por glucosa y otros azúcares C₆ tales como la manosa y la galactosa así como uno o más azúcares C₅ tales como la xilosa y la arabinosa.

20 Cuando el tunicado se somete a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos, el hidrolizado puede contener monosacáridos que ya existían en el tunicado así como monosacáridos que se han producido por la hidrólisis de celulosa y otros componentes.

25 Los métodos de hidrólisis enzimática y ácida seguida por la fermentación utilizados en la presente divulgación no están limitados e incluyen cualquier método conocido por los expertos en la materia y se describen en las siguientes publicaciones:

30 Li J, Lennholm H, Henriksson G, Gellerstedt G (2000a). Bio-refinery of lignocellulosic materials for ethanol production. I. Quantification of carbohydrates, 13^{er} Simposio internacional de alcohol combustible (ISAF XIII) (Estocolmo, 3-6 de julio de 2000), procedimientos (Vol. I), Número 6;

Li J, Lennholm H, Henriksson G, Gellerstedt G (2000b). Bio-refinery of lignocellulosic materials for ethanol production. II. Fundamentals and strategic design of steam explosion, 1^a Conferencia mundial y exhibición sobre la biomasa para energía e industria (Sevilla, 5-9 de junio de 2000), procedimientos, 767-770;

35 Li J, Lennholm H, Henriksson G, Gellerstedt G (2001). Bio-refinery of lignocellulosic materials for ethanol production. III. Evaluation of steam explosion by kappa number determination, 7^o Simposio brasileño de química de ligninas y otros componentes de la madera, (Belo Horizonte, 3-5 de septiembre de 2001), procedimientos (presentación oral), 423-430;

40 Li J, Lennholm H, Henriksson G, Gellerstedt G (2002). Bio-refinery of lignocellulosic materials for ethanol production. IV. Manufacture of high value by-products for improvement of process economic feasibility, 2^o Simposio internacional sobre tecnologías emergentes de la elaboración de pulpa y de la fabricación de papel, (Guangzhou, 9-11 de octubre de 2002), procedimientos, 82-90;

45 Lin Y, Tanaka S (2006). ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(6): 627-642; y

50 Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G (2006). Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* 24(12): 549-556.

En un aspecto, el método de la divulgación implica la hidrólisis ácida del tunicado. Preferentemente, se usa ácido sulfúrico, por ejemplo, ácido sulfúrico concentrado tal como 72-74 % de H₂SO₄.

55 En un aspecto, el método de la divulgación implica la hidrólisis enzimática del tunicado. Una o más enzimas pueden usarse incluyendo enzimas para convertir polisacáridos en monosacáridos. Preferentemente, una o más enzimas convierten la celulosa en glucosa, por ejemplo, la celulasa y la glucosidasa.

En un aspecto preferido, el hidrolizado comprende glucosa y esta se fermenta en etanol usando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, conocidas comúnmente como levadura de panadería.

60 La recuperación del alcohol, preferentemente etanol, puede lograrse mediante la destilación para separar el alcohol, preferentemente etanol, a partir de otros componentes del caldo de fermentación y deshidratación para eliminar cualquier agua residual del alcohol, preferentemente etanol.

Preferentemente, la divulgación se refiere al uso de un extracto obtenido a partir de un tunicado como la biomasa para la producción de un alcohol. Preferentemente, la divulgación se refiere a un método para producir un alcohol a partir de un tunicado en donde dicho método comprende:

(i) extraer uno o más polisacáridos de dicho tunicado y someter dichos uno o más polisacáridos a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos; y

(ii) fermentar dichos uno o más monosacáridos para formar un alcohol.

El tunicado puede estar en la forma del conjunto del cuerpo del tunicado o puede estar en la forma de parte del cuerpo de un tunicado, preferentemente la túnica que se ha aislado del resto del cuerpo del tunicado. El tunicado puede, por ejemplo, cosecharse recientemente o descongelarse de un suministro congelado. Preferentemente, el tunicado se lava para eliminar las sales marinas. Preferentemente, este lavado se realiza en un tunicado húmedo, es decir, un tunicado que no se ha sometido a secado y preferentemente el lavado se realiza con agua desionizada o dulce.

Antes de someter el tunicado a hidrólisis enzimática o ácida, el tunicado se seca preferentemente. Preferentemente, la divulgación se refiere a un método para producir un alcohol a partir de un tunicado en donde dicho método comprende:

(i) secar dicho tunicado;

(ii) extraer uno o más polisacáridos de dicho tunicado y someter dichos uno o más polisacáridos a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos; y

(iii) fermentar dichos uno o más monosacáridos para formar un alcohol.

El secado puede llevarse a cabo mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, el tunicado se seca hasta un contenido de sequedad (también denominado en el presente documento como sequedad) de más del 50 %, más preferentemente, hasta más del 70 %, más preferentemente, hasta más del 80 %, más preferentemente, hasta más del 85 % e incluso más preferentemente hasta más del 90 %. El tunicado puede secarse presionándolo para eliminar parte del agua, extendiéndolo sobre un suelo caliente para secarlo hasta, por ejemplo, aproximadamente un 39 % de sequedad. Después, el tunicado puede transferirse a un horno, por ejemplo, calentado a 130 - 150 °C, donde se seca hasta, por ejemplo, aproximadamente un 89 % de sequedad. Como alternativa, el tunicado puede secarse por liofilización o secarse por secado por pulverización, por ejemplo, a temperaturas de más de 100 °C en una escala de tiempo en segundos. El uso de tunicado seco tiene la ventaja de minimizar los efectos inhibitorios sobre cualquier hidrólisis enzimática posterior. En un aspecto, el material de tunicado se puede romper mecánicamente, por medio de trituración, por ejemplo.

En este aspecto de la divulgación, uno o más polisacáridos se extraen del tunicado. El método de extracción no está limitado e incluye cualquier método conocido por los expertos en la materia. Preferentemente, la extracción implica tratar el tunicado seco de modo que cualquier estructura de tipo lignina presente se rompa, junto con la separación de uno o más polisacáridos. Preferentemente dichos uno o más polisacáridos comprenden celulosa. El tunicado puede procesarse en una pulpa rica en celulosa por medios tales como los descritos en Young-Seok Koo et al, "Preparation and Properties of Chemical Cellulose from Ascidian Tunic and Their Regenerated Cellulose Fibers", Journal of applied Polymer Science, Vol. 85, 1634-1643 (2002). En esta referencia, la materia prima del tunicado se seca y se reduce a polvo usando un molino. El polvo se trata con una solución ácida acuosa (H₂SO₄), se filtra, se lava con acetona y agua y se seca al vacío a 75 °C. La muestra se trata después con una solución acuosa alcalina (NaOH/Na₂S) y se filtra, se lava y se seca como antes. Finalmente, la muestra se trata con un agente blanqueador (solución de NaOCl acuosa) y se filtra, se lava y se seca como antes. La muestra resultante es rica en celulosa.

En un aspecto preferido de la divulgación, se extrae la celulosa del tunicado sometiendo el tunicado a una etapa de secado, una etapa de tratamiento con ácido, una etapa de tratamiento alcalino y una etapa de oxidación/blanqueamiento. Las tres etapas de la etapa de tratamiento con ácido, la etapa de tratamiento alcalino y la etapa de oxidación/blanqueamiento constituyen un régimen de tratamiento que facilita la extracción de la celulosa del tunicado seco, por ejemplo, rompiendo cualquier estructura de tipo lignina presente. Después de este régimen de tratamiento, el producto polisacárido sólido puede separarse por filtración o centrifugación. El producto polisacárido después puede lavarse y secarse. La etapa de secado es como se ha descrito anteriormente. La etapa de tratamiento con ácido, la etapa de tratamiento alcalino y la etapa de oxidación/blanqueamiento se describen adicionalmente a continuación.

La etapa de tratamiento con ácido es una etapa de hidrólisis ácida. La muestra seca se trata con una solución ácida acuosa, por ejemplo, 0,9 % en peso de H₂SO₄ a 180 °C durante 2 horas. El producto resultante se filtra, se lava y se seca, por ejemplo, a 50 °C.

La etapa de tratamiento alcalino es una etapa alcalina de hidrólisis/elaboración de pasta Kraft. El producto de la etapa de tratamiento con ácido se trata con una solución alcalina acuosa, por ejemplo, 9/3 % en peso de solución de NaOH/Na₂S a 180 °C durante 2 horas. El producto resultante se filtra, se lava y se seca, por ejemplo, a 50 °C.

La etapa de oxidación/blanqueamiento implica tratar el producto a partir de la etapa de tratamiento alcalino con un agente blanqueador, por ejemplo, 2,9 % en peso de solución de NaOCl a 75 °C durante 1 hora. El producto resultante se filtra, se lava y se seca, por ejemplo, a 50 °C.

El resultado es un extracto de un tunicado que es rico en celulosa. Este extracto puede someterse después a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos. A esto le sigue la fermentación del hidrolizado para producir un alcohol. Las etapas de hidrólisis enzimática y ácida seguida por la fermentación y recuperación del alcohol que pueden utilizarse en este aspecto de la divulgación son como se ha descrito anteriormente. En un aspecto, el método de la divulgación implica la hidrólisis ácida de uno o más polisacáridos extraídos del tunicado. Preferentemente, se usa ácido sulfúrico. En un aspecto, el método de la divulgación implica la hidrólisis enzimática de uno o más polisacáridos extraídos del tunicado. Una o más enzimas pueden usarse incluyendo enzimas para convertir polisacáridos en monosacáridos. Preferentemente, una o más enzimas convierten la celulosa en glucosa, por ejemplo, la celulasa y la glucosidasa.

La divulgación proporciona además un método de producción de un alcohol a partir de un tunicado o un extracto obtenido a partir de un tunicado como se ha descrito en el presente documento, método que también comprende un método de cría de dicho tunicado, en donde dicho tunicado es una ascidia. El método de cultivo incluye la cría y la cosecha de dicho tunicado y es como se describe en el presente documento.

Biodiésel

En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de un tunicado o extracto obtenido de un tunicado para la producción de biodiésel.

El biodiésel puede producirse a partir de lípidos usando la transesterificación. El componente primario del biodiésel comprende ésteres alquílicos de ácidos grasos, en particular, ésteres metílicos (o etílicos) de ácidos grasos. Típicamente, en la producción de biodiésel, los lípidos se mezclan con hidróxido de potasio o de sodio y metanol (o etanol) y la reacción química produce el éster metílico (o etílico) de ácido y glicerol.

Los presentes estudios demuestran que *C. intestinalis* tiene un 3,2 % en peso de contenido de lípidos en bruto. El uso del modelo de cría tridimensional mencionado anteriormente da como resultado un rendimiento de 29.000 l de lípidos animales por hectárea de área de superficie oceánica además del etanol. Estos lípidos animales proporcionan una materia prima para la producción de biodiésel a través de la transesterificación o la alcoholólisis¹⁹. Usando estimaciones de la bibliografía sobre *C. intestinalis* de 100 mm de largo de 0,6 g (peso en seco), y densidades de 3000 individuos por m² sobre el suelo oceánico, se obtendrá un rendimiento de biodiésel de 0,058 l/m² (3.000 individuos/m² x 0,0006 kg/individuo x 0,032 = 0,058 l/m²), o 580 l/hectárea. Este cálculo está basado en una cosecha. Como es posible cosechar *C. intestinalis* al menos dos veces por año, hay potencial para un rendimiento anual de biodiésel de al menos 1.150 l/hectárea de suelo oceánico (2 cosechas por año x 580 l/hectárea). Sin embargo, este cálculo se realiza para la cría bidimensional, por ejemplo, en el suelo oceánico. Debido a que las ascidias se pueden criar en tres dimensiones en la columna de agua del océano, el rendimiento de biodiésel potencial por hectárea de suelo oceánico/superficie oceánica es mucho mayor. Tomando una situación en la que las ascidias se cultivan en bastones sumergidos que tienen una longitud de 20 m y un diámetro de 0,4 m (dando un área superficial de 25,12 m² por bastón) y que están separados de 1 m a lo largo de 1 hectárea (es decir, 10.000 bastones). Esto proporciona 251.200 m² de área superficial para el crecimiento de ascidias por hectárea de superficie oceánica. De esta manera, basándose en los cálculos anteriores, a su vez, podría producir una producción anual de aproximadamente 29.000 l de biodiésel por hectárea de superficie oceánica.

Los presentes estudios han demostrado que este rendimiento puede ser mucho mayor que la estimación anterior. Los presentes estudios han demostrado que *C. intestinalis* puede cultivarse hasta aproximadamente 31 g (1,37 g de peso en seco) después de 6 meses de despliegue. Además, en el presente documento se describe el uso de miembros alargados que soportan una pluralidad de superficies de colonización en forma de platos, se pueden alcanzar densidades de 9690 individuos por m². En un modelo de cría tridimensional, asumiendo 3 platos por metro de longitud en una cuerda de 20 metros y un área superficial de plato de 0,2 m², habrá un área superficial de 12 m² por miembro alargado en el mar, o 120.000 m² por hectárea si los miembros alargados están separados de 1 m. Asumiendo 2 cosechas por año, el rendimiento anual de biodiésel por hectárea es aproximadamente 102.000 l usando el mismo cálculo que antes (9690 individuos/m² x 0,00137 kg x 0,032 lípidos x 120.000 m² x 2 cosechas por año = 102.000 l de biodiésel).

Preferentemente, la divulgación se refiere al uso de un tunicado como biomasa para la producción de biodiésel. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método de producción de biodiésel a partir de un tunicado en donde dicho método comprende someter dicho tunicado a transesterificación o alcoholólisis. En este método, los lípidos presentes en el tunicado se convierten en biodiésel por la transesterificación o la alcoholólisis. En este aspecto de la divulgación, el tunicado mismo se somete a la transesterificación o alcoholólisis y no es necesaria ninguna extracción de lípidos/ácidos grasos del tunicado.

El tunicado puede estar en la forma del conjunto del cuerpo del tunicado o puede estar en la forma de parte del cuerpo de un tunicado, tal como la túnica que se ha aislado del resto del cuerpo del tunicado. El tunicado puede, por ejemplo, cosecharse recientemente o descongelarse de un suministro congelado. Preferentemente, el tunicado se lava para eliminar las sales marinas. Preferentemente, este lavado se realiza en un tunicado húmedo, es decir, un tunicado que no se ha sometido a secado y preferentemente el lavado se realiza con agua desionizada o dulce. Esto reduce ventajosamente el contenido de ceniza del material de tunicado resultante.

Antes de someter el tunicado a transesterificación, el tunicado se seca preferentemente. Preferentemente, la divulgación se refiere a un método para producir biodiésel a partir de un tunicado en donde dicho método comprende las etapas de secar dicho tunicado y de someter dicho tunicado seco a transesterificación o alcoholólisis.

El secado puede llevarse a cabo mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, el tunicado se seca hasta un contenido de sequedad (también denominado en el presente documento como sequedad) de más del 50 %, más preferentemente, hasta más del 70 %, más preferentemente, hasta más del 80 %, más preferentemente, hasta más del 85 % e incluso más preferentemente hasta más del 90 %. El tunicado puede secarse presionándolo para eliminar parte del agua, extendiéndolo sobre un suelo caliente para secarlo hasta, por ejemplo, aproximadamente un 39 % de sequedad. Después, el tunicado puede transferirse a un horno, por ejemplo, calentado a 130 - 150 °C, donde se seca hasta, por ejemplo, aproximadamente un 89 % de sequedad. Como alternativa, el tunicado puede secarse por liofilización o secarse por secado por pulverización, por ejemplo, a temperaturas de más de 100 °C en una escala de tiempo en segundos. El uso de tunicado seco tiene la ventaja de minimizar los efectos inhibitorios que tiene el agua sobre la reacción de transesterificación. En una realización, el material de tunicado se puede romper mecánicamente, por medio de trituración, por ejemplo.

Los tunicados comprenden lípidos y/o ácidos grasos de origen natural. Los lípidos que se originan de forma natural en tunicados incluyen ácidos grasos y sus derivados (incluyendo monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos (también conocidos como grasas)), esteroides, fosfolípidos y esfingolípidos. Además, el tunicado también comprende ácidos grasos. Los presentes estudios han demostrado que *C. intestinalis* contiene la composición de ácidos grasos mostrada en la figura 1. Los ácidos grasos se identifican en el presente documento por un primer número que indica el número de átomos de carbono y un segundo número que es el número de dobles enlaces. El símbolo n3 indica que el ácido graso es un ácido graso omega-3 que es un ácido graso insaturado con el tercer enlace del extremo de metilo del ácido graso siendo un doble enlace. Sin limitación, los ácidos grasos aislados de tunicados pueden comprender uno o más de los siguientes ácidos grasos: 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:4, 20:0, 20:1, 20:5-n3 (ácido eicosapentaenoico); 21:5-n3; 22:6-n3 (ácido docosahexaenoico); y 22:5-n3. Sin limitación, los ácidos grasos aislados de tunicados pueden comprender uno o más de los siguientes ácidos grasos: 16:0, 16:1, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 20:5-n3 (ácido eicosapentaenoico); [21:5-n3]; y 22:6-n3 (ácido docosahexaenoico). Sin limitación, los ácidos grasos aislados de tunicados pueden comprender uno o más de los siguientes ácidos grasos: 14:0, 16:0, 16:1, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 20:5-n3 (ácido eicosapentaenoico); 21:5-n3; 22:6-n3 (ácido docosahexaenoico); y 22:5-n3. Además, los presentes estudios demuestran que *C. intestinalis* contiene muy poco a nada de glicerol. Esto se puede observar en los resultados de RMN H dados en la figura 2. Esto es particularmente ventajoso ya que el glicerol es un subproducto en el proceso de fabricación de biodiésel y se tiene que eliminar.

En el método divulgado en el presente documento, los lípidos del tunicado se convierten en biodiésel por transesterificación o alcoholólisis. La transesterificación es el término general utilizado para describir la clase de reacciones orgánicas donde un éster se transforma en otro éster a través del intercambio del resto alcoxi. Los lípidos del tunicado incluyen ésteres tales como mono-, di- y triglicéridos. Cuando estos se transesterifican por la reacción con un alcohol entonces el proceso de transesterificación se conoce también como alcoholólisis. Los lípidos del tunicado también contienen ácidos grasos libres. Cuando se reacciona un ácido graso con un alcohol este proceso se llama alcoholólisis.

En la transesterificación de grasas o triglicéridos, el triglicérido reacciona con un alcohol en presencia de un ácido o base fuerte para producir una mezcla de ésteres de ácidos grasos y glicerol. Típicamente, el alcohol es un alcohol monohídrico elegido de metanol, etanol, propanol o butanol. Típicamente, el catalizador básico es NaOH o KOH. Típicamente, el catalizador ácido es ácido sulfúrico concentrado. Para la producción de biodiésel, la transesterificación catalizada con base de triglicéridos se usa comúnmente ya que procede más rápido que la transesterificación catalizada con ácido.

Los presentes estudios han demostrado que los tunicados pueden tener un alto contenido de ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres, cuando están presentes, pueden provocar un problema en la transesterificación catalizada con base al reaccionar con el catalizador básico inorgánico neutralizando así el catalizador y formando jabón. Para evitar que esto ocurra, la transesterificación catalizada con ácido puede usarse tal y como se describe en Gemma Vicente et al., "Direct Transformation of Fungal Biomass from Submerged Cultures into biodiesel. Energy Fuels", 2010, 24: 3173-3178; y Freeman B, Pryde E H, et al., "Variable affecting the yields of fatty acid esters from transesterified vegetable oils", JAOCS. 1984, 61 (1): 1683-1687.

En un aspecto, se puede usar un proceso de transesterificación de dos fases. Esto puede implicar una primera fase donde los lípidos del tunicado reaccionan con un alcohol en presencia de un catalizador básico, por ejemplo,

reaccionan con metanol en presencia de KOH, seguido por una segunda fase donde los lípidos reaccionan con un alcohol pero en presencia de un catalizador ácido, por ejemplo, reaccionan con metanol en presencia de BF_3 . La cantidad de ácidos grasos presentes puede determinarse por filtración de una muestra de la mezcla de lípidos con una solución básica estándar. En el caso de una gran cantidad de ácidos grasos libres en los lípidos del tunicado, el tunicado (o lípidos/ácidos grasos del tunicado) puede someterse a un proceso de dos estadios que implica un proceso de esterificación como un primer estadio que se realiza antes del proceso de transesterificación que es el segundo estadio. En el primer estadio del proceso de esterificación, los ácidos grasos libres se esterifican con el alcohol en presencia de un catalizador ácido tal como H_2SO_4 concentrado. El producto de reacción contiene una fase lipídica que contiene los ésteres de ácidos grasos recién formados y una fase de glicerol. La fase de glicerol puede eliminarse y la fase lipídica puede someterse a la transesterificación del segundo estadio tal como se ha descrito anteriormente. Los procesos típicos de dos estadios se describen en Zullaikah S, Lai C C, Vali S R, et al. "A two- step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil", *Bioresource Technology*, 2005, (96): 1889-1896, en Ghadge S V, Raheman H., "Biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil having high free fatty acids", *Biomass and Bioenergy*, 2005, (28): 601-605 y en Chen S, JianG J, Nie X, Chang X, "Study on Preparation of biodiesel from Waste Acidificated Oil of High-acid-value", *Chemistry and industry of forest products*, 2009, 29(4): 47-52.

Un proceso alternativo es la esterificación simultánea de los ácidos grasos libres y la transesterificación de triglicéridos usando el catalizador enzimático como una lipasa. Un proceso de este tipo se describe en Li N W, Zong M H, Wu H., "Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*", *Process Biochemistry*, 2009, 44: 685-688.

Un proceso alternativo es la transesterificación supercrítica con metanol que no requiere ningún catalizador y por lo tanto elimina el problema formándose el jabón a partir de los ácidos grasos libres. Un proceso de este tipo se describe en Demirbas A, "Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical metanol transesterification methods", *Progress in Energy and Combustion Science*, 2005, 31: 466-487.

La transesterificación o alcoholólisis se puede realizar por medios conocidos en la técnica tal como se describe en el documento WO 2009089802.

Preferentemente, cuando se obtienen como lípidos frescos a partir de tunicados frescos, el método preferido es la transesterificación catalizada con álcali. Cuando el valor de ácido es alto, por ejemplo, para lípidos obtenidos de muestras de largo almacenamiento de tunicados, se prefiere la alcoholólisis catalizada con ácido o un método de dos fases (estadios) como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente, el biodiésel se recupera a partir de la mezcla de reacción de transesterificación o alcoholólisis. Los productos biodiésel y glicerol son inmiscibles. El biodiésel se puede recuperar de la mezcla de reacción por una serie de etapas de centrifugación y separación (para eliminar el resto del tunicado), evaporación y extracción con disolvente.

Preferentemente, la divulgación se refiere al uso de un extracto obtenido a partir de un tunicado como una biomasa para la producción de biodiésel. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para producir biodiésel a partir de un tunicado en donde dicho método comprende:

(i) extraer los lípidos/ácidos grasos de dicho tunicado y

(ii) convertir dichos lípidos/ácidos grasos en biodiésel por transesterificación o alcoholólisis.

En una realización preferida, este aspecto de la divulgación se refiere a un método para producir ésteres alquílicos de ácidos grasos. Preferentemente, los ésteres alquílicos de ácidos grasos son ésteres de metilo o de etilo.

El tunicado puede estar en la forma del conjunto del cuerpo del tunicado o puede estar en la forma de parte del cuerpo de un tunicado, tal como la túnica que se ha aislado del resto del cuerpo del tunicado. El tunicado puede, por ejemplo, cosecharse recientemente o descongelarse de un suministro congelado. Preferentemente, el tunicado se lava para eliminar las sales marinas. Preferentemente, este lavado se realiza en un tunicado húmedo, es decir, un tunicado que no se ha sometido a secado y preferentemente el lavado se realiza con agua desionizada o dulce.

En el método divulgado en el presente documento la extracción de lípidos/ácidos grasos del tunicado se puede realizar por medios conocidos en la técnica tales como filtración-centrifugación, extracción con disolvente, extracción con ácido, presión y destilación. Preferentemente, se usa la extracción con disolvente y preferentemente se realiza usando éter de dietilo o éter de petróleo. Preferentemente, se utiliza la extracción con Soxhlet. Preferentemente, se utiliza la extracción con Soxhlet usando éter de petróleo. Después de una etapa de extracción con Soxhlet, el producto resultante se puede filtrar para separar el filtrado del resto del tunicado y después evaporar el filtrado para producir los lípidos/ácidos grasos.

Antes de la etapa de extracción de los lípidos/ácidos grasos del tunicado, preferentemente se seca el tunicado. En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para producir biodiésel a partir de un tunicado en donde dicho método comprende:

(i) secar el tunicado;

(ii) extraer los lípidos/ácidos grasos de dicho tunicado seco y

(iii) convertir dichos lípidos/ácidos grasos en biodiésel por transesterificación o alcoholísis.

El secado se puede realizar como se ha descrito anteriormente.

En el método divulgado en el presente documento, los lípidos/ácidos grasos extraídos se convierten en biodiésel por transesterificación o alcoholísis. La transesterificación o alcoholísis de los lípidos/ácidos grasos se puede realizar como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente, el biodiésel se recupera a partir de la mezcla de reacción de transesterificación o alcoholísis. El biodiésel se puede recuperar de la mezcla de reacción por una serie de etapas de separación, evaporación y extracción con disolvente.

Cuando está en uso, el biodiésel se puede usar solo o mezclado con un diésel mineral, por ejemplo, en cantidades de hasta el 15 % de biodiésel mezclado con diésel mineral.

La divulgación proporciona además un método para producir biodiésel a partir de un tunicado o un extracto obtenido a partir de un tunicado como se ha descrito en el presente documento, método que también comprende un método de cría de dicho tunicado, en donde dicho tunicado es una ascidia. El método de cultivo incluye la cría y la cosecha de dicho tunicado y es como se describe en el presente documento.

Método integrado

En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de un tunicado para la producción de más de un biocombustible seleccionado de un alcohol y biodiésel. Específicamente, la divulgación proporciona un método de producción de un primer biocombustible a partir de un tunicado de acuerdo con uno de los métodos mencionados anteriormente y adicionalmente la producción de un segundo biocombustible a partir de dicho tunicado en donde el primer y el segundo biocombustibles son diferentes y están seleccionados de un alcohol y biodiésel.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método de producción de un alcohol a partir de un tunicado de acuerdo con el método descrito anteriormente, método que comprende además la producción de biodiésel a partir de dicho tunicado de acuerdo con uno de los métodos descritos anteriormente.

En este aspecto de la divulgación, preferentemente se seca primero el tunicado. El secado se puede realizar como se ha descrito anteriormente. Después el uno o más polisacáridos y ácidos grasos/lípidos se extraen de dicho tunicado y se usan para producir los biocombustibles relevantes en los métodos descritos anteriormente.

En un aspecto, el método implica:

(i) secar el tunicado

(ii) extraer uno o más polisacáridos de dicho tunicado seco y someter dichos uno o más polisacáridos a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos;

(iii) fermentar dichos uno o más monosacáridos para formar un alcohol;

en donde durante la etapa (ii) o etapa (iii), al menos se forma una solución que contiene lípidos/ácidos grasos y el método implica además extraer dichos lípidos/ácidos grasos de dicha solución y convertir dichos lípidos/ácidos grasos en biodiésel mediante transesterificación o alcoholísis. La solución puede formarse (a) durante la etapa de extracción de uno o más polisacáridos a partir de dicho tunicado seco y/o (b) durante la etapa de sometimiento de dicho uno o más polisacáridos a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos, y/o (c) durante o después de la etapa de fermentación. En (a) la solución puede formarse durante el tratamiento del tunicado seco para enriquecer el contenido de celulosa o azúcar C6 en el resto. En (b) la solución puede ser el hidrolizado. En (c) la solución puede ser el caldo de fermentación. Los lípidos/ácidos grasos formarán una capa flotante en dichas soluciones con o sin la ayuda de la adición de un disolvente orgánico más débil que el agua. Los lípidos/ácidos grasos pueden recuperarse por medios conocidos en la técnica.

En otro aspecto, el método implica:

(i) secar el tunicado

(ii) someter dicho tunicado seco a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos;

(iii) fermentar dichos uno o más monosacáridos para formar un alcohol;
5 en donde durante la etapa (ii) o (iii), al menos se forma una solución que contiene lípidos/ácidos grasos y el método implica además extraer dichos lípidos/ácidos grasos de dicha solución y convertir dichos lípidos/ácidos grasos en biodiésel mediante transesterificación o alcoholólisis. La solución puede ser el hidrolizado o el caldo de fermentación. Los lípidos/ácidos grasos formarán una capa flotante en dichas soluciones y pueden recuperarse por medios conocidos en la técnica.

10 En otro aspecto, el método implica:

(i) secar el tunicado;

15 (ii) extraer los lípidos/ácidos grasos de dicho tunicado seco;

(iii) convertir dichos lípidos/ácidos grasos en biodiésel por transesterificación o alcoholólisis;

20 en donde durante la etapa de extracción de los lípidos/ácido graso de dicho tunicado, se forma un resto de tunicado y el método implica además extraer uno o más polisacáridos de dicho resto de tunicado, someter dicho uno o más polisacáridos a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos y fermentar dicho uno o más monosacáridos para formar un alcohol.

25 En otra realización, el método implica:

(i) secar el tunicado;

(ii) someter dicho tunicado seco a transesterificación o alcoholólisis convirtiendo así los lípidos/ácidos grasos presentes en dicho tunicado seco en biodiésel;

30 (iii) recuperar el biodiésel;

35 en donde durante la etapa de recuperación del biodiésel de dicho tunicado seco, se forma un resto de tunicado y el método implica además extraer uno o más polisacáridos de dicho resto de tunicado, someter dicho uno o más polisacáridos a hidrólisis enzimática o ácida para formar un hidrolizado que contiene uno o más monosacáridos y fermentar dicho uno o más monosacáridos para formar un alcohol.

40 En los aspectos descritos anteriormente para el aspecto del método integrado de la divulgación, se puede omitir la etapa de secado.

Los métodos de extracción de uno o más polisacáridos, hidrólisis enzimática o ácida, fermentación, extracción de lípidos/ácidos grasos, transesterificación o alcoholólisis, recuperación del alcohol y/o biodiésel se conocen en la técnica o son como se ha descrito anteriormente.

45 Este aspecto de la divulgación tiene una clara ventaja en que resulta en un mayor resultado de biocombustible por unidad de peso de biomasa de tunicado y además aumenta el área oceánica basándose en la producción de biocombustible.

50 Ampliación industrial

Los métodos de la presente divulgación son adecuados para la ampliación industrial. Para los métodos de producción de alcohol divulgados en el presente documento, se pueden usar los reactores existentes usados en la industria de la pulpa o papel, por ejemplo. Para los métodos de producción de biodiésel divulgados en el presente documento, se podrían usar los reactores existentes para la producción de biodiésel a partir de aceite vegetal, por ejemplo.

55 Cría tridimensional

60 La invención se refiere a un método de cría tridimensional de ascidias en el mar. El objeto es proporcionar un método de cría que permite la producción de grandes cantidades de ascidias. Otro objeto es proporcionar un método de cría que favorece la selección natural y asentamiento de ascidias y no implica una etapa en la que la población de ascidias tiene que ser sembrada o suministrada a partir de plantas de vivero. Otro objeto es proporcionar un método de cría que resulta en el crecimiento de un monocultivo de ascidias con bioincrustación mínima provocada por la colonización de organismos distintos de las ascidias. Cada una de las realizaciones de los métodos de cría tridimensional que se describen en el presente documento satisface al menos uno de estos objetivos.

65 En un aspecto, la invención se refiere a un método de cría tridimensional de ascidias en el mar.

En este aspecto, la invención se refiere a un método de cría de ascidias que comprende las etapas de:

- 5 (a) colonizar superficies de una estructura submarina con ascidias; y
 (b) cosechar dichas ascidias de dicha estructura,

10 en donde dicha estructura comprende una pluralidad de miembros alargados y define una región submarina tridimensional dispuesta para soportar la colonización de tunicados y, además, en donde la pluralidad de miembros alargados comprende al menos un miembro de soporte alargado y una pluralidad de miembros de colonización, en donde cada miembro de colonización está acoplado a dicho miembro de soporte y comprende al menos una superficie de colonización plana y horizontal que es uniforme y sin interrupción y en la forma de un plato o disco.

15 Preferentemente, la colonización de las superficies de la estructura submarina se consigue por selección natural y asentamiento de ascidias.

Como se usa en el presente documento, un miembro alargado puede ser una cuerda (Figura 3), bastón o cilindro hueco. Preferentemente, la cuerda, bastón o cilindro hueco tiene un diámetro de 1 a 10 cm, más preferentemente, un diámetro de 2 a 4 cm, incluso más preferentemente 2 cm.

20 Al menos un miembro alargado tiene una función de soporte. El miembro alargado puede denominarse un miembro de soporte alargado y se proporciona con una pluralidad de miembros de colonización en donde dicho miembro de colonización se acopla a dicho miembro de soporte. Cada miembro de colonización comprende al menos una superficie de colonización. La superficie de colonización es uniforme y sin interrupción.

25 Al menos una de las superficies de colonización es plana y horizontal. En este contexto, el término horizontal está relacionado con el miembro alargado (o miembro de soporte alargado). Los presentes estudios demuestran que una superficie de este tipo favorece la dominación de las ascidias (bioincrustación reducida).

30 Al menos uno de los miembros de colonización que tienen una superficie plana está en forma de plato o disco. Preferentemente son discos de aproximadamente 0,4-0,6 m de diámetro y, en una realización, se colocan a una distancia de 1 - 3 m separados del miembro alargado. En otra realización, los discos se colocan a una distancia de 0,2 - 1 m separados del miembro alargado, preferentemente 0,3 - 0,5 m. Estos se pueden unir al miembro alargado por medios conocidos en la técnica. Las superficies o miembros de colonización pueden ser platos que son de forma cuadrada o rectangular. Estos pueden tener una anchura o longitud de aproximadamente 0,2 - 1,5 m. Preferentemente, tienen una anchura o longitud de aproximadamente 0,2 - 0,6 m, más preferentemente, tienen una anchura o longitud de aproximadamente 0,4 - 0,6 m. En una realización, estos se colocan a distancias de 1 - 3 m separados del miembro alargado. En otra realización, se colocan a distancias de 0,2 - 1 m separados del miembro alargado, preferentemente 0,3 - 0,5 m. Estos se pueden unir al miembro alargado por medios conocidos en la técnica.

40 En caso necesario, los miembros de colonización pueden acoplarse a más de un miembro alargado.

Los miembros de colonización se sitúan preferentemente a lo largo del miembro de soporte alargado separado al menos 20 cm, preferentemente están separados entre 25 cm y 1 m. Como los miembros de colonización tienen superficies planas horizontales, esta distancia se requiere para permitir un crecimiento suficiente de las ascidias.

45 En una realización, un miembro alargado soporta una pluralidad de superficies o miembros de colonización que se extienden generalmente radialmente.

50 Las superficies o miembros de colonización que se extienden generalmente radialmente pueden tener forma de disco (Figura 5). Preferentemente, son discos de aproximadamente 0,4-0,6 m de diámetro y, en una realización, se colocan a una distancia de 1 - 3 m separados del miembro alargado. En otra realización, los discos se colocan a una distancia de 0,2 - 1 m separados del miembro alargado, preferentemente 0,3 - 0,5 m. Estos se pueden unir al miembro alargado por medios conocidos en la técnica.

55 Las superficies o miembros de colonización que se extienden generalmente radialmente pueden tener forma rectangular. Preferentemente, tienen una anchura o longitud de aproximadamente 0,2 - 0,6 m, más preferentemente, tienen una anchura o longitud de aproximadamente 0,4 - 0,6 m. En una realización, estos se colocan a distancias de 1 - 3 m separados del miembro alargado. En otra realización, se colocan a distancias de 0,2 - 1 m separados del miembro alargado, preferentemente 0,3 - 0,5 m. Estos se pueden unir al miembro alargado por medios conocidos en la técnica.

60 Cuando están en uso, los miembros alargados pueden unirse a un sistema de palangre de superficie, usando una boya o un peso para mantener el miembro alargado vertical en el agua (Figuras 2, 3 y 4).

65 Una estructura o aparato submarinos usados para colonizar los tunicados se describirán ahora con referencia a la figura 7 y los ejemplos A a E. Los ejemplos C y D no forman parte de la invención.

- 5 La figura 7 ilustra un sistema de palangre (1) para la colonización de tunicados. El sistema de palangre (1) consiste en un número de miembros alargados (3) acoplados a un palangre (2). El palangre mismo está unido a al menos una boya de nivel (4) a lo largo de la parte central del palangre (2) para mantenerlo en la correcta orientación en el agua. Los extremos del palangre (2) se unen al lecho marino (5).
- Una boya (6) se une también a un extremo de cada uno de los miembros alargados (3) y un peso (7) se une al otro extremo para mantener los miembros alargados (3) verticales en el agua.
- 10 Tal como se ilustra en la Figura 7, una variedad de distintas estructuras de miembro alargado (3) puede utilizarse en combinación con el palangre (2).
- Como se muestra en cada ejemplo, los miembros alargados (3) comprenden una pluralidad de miembros de colonización (8) en una formación de pila o matriz.
- 15 Los miembros de colonización (8) que incluyen al menos una superficie plana pueden favorecerse con respecto a otras formas puesto que la superficie plana facilita la colonización y la cosecha según se ha mencionado anteriormente.
- 20 Los miembros alargados (3) mostrados en los ejemplos A y B incluyen una pluralidad de miembros de colonización planos (8a-8e). El miembro alargado (3) se acopla a los miembros de colonización (8) a través del centro del miembro de colonización (8) (un disco en el ejemplo A y un cuadrado en el ejemplo B) utilizando una disposición de acoplamiento adecuada.
- 25 Los miembros de colonización (8) mismos tienen cada uno al menos una superficie sin interrupción, es decir, sin crestas sustantivas, proyecciones o similares que se extiendan desde la superficie que sería perjudicial para la colonización del tunicado. Además, una superficie de este tipo desalienta la bioincrustación provocada por el asentamiento de organismos distintos de las ascidias.
- 30 Los ejemplos C y D son cilíndricos y tienen una superficie sin interrupción, la superficie externa circunferencial forma el cilindro. En un aspecto, el cilindro está abierto en ambos extremos y la superficie interna circunferencial que forma el cilindro también es una superficie sin interrupción. En un aspecto, el miembro de colonización es un cilindro con uno o ambos extremos cubiertos que forman las superficies planas superior y/o inferior. En este aspecto, el cilindro tiene tres superficies sin interrupción, es decir, una superficie superior e inferior y una superficie circunferencial que forma el cilindro. Los ejemplos C y D no forman parte de la invención.
- 35 Los ejemplos A, B y E tienen cada uno dos superficies planas por miembro de colonización (8) (una superficie superior y una de la parte inferior).
- 40 Las superficies planas de los miembros de colonización (8a y 8b) proporcionan una superficie sin interrupción que se extiende circunferencialmente y radialmente alrededor del acoplamiento del miembro alargado (3) hasta el miembro de colonización (8). Por lo tanto, el acceso a la superficie es sin restricción permitiendo que los tunicados colonicen fácilmente la superficie. Adicionalmente, este acceso facilita la cosecha de los tunicados a partir del miembro de colonización (8). Los ejemplos C y D comprenden la superficie externa circunferencial que está sin interrupción de manera similar permitiendo nuevamente la colonización y la cosecha. Los ejemplos C y D no forman parte de la invención.
- 45 Los miembros de colonización (8) pueden tener cualquier forma adecuada tal como un disco circular (8a) como se muestra en el ejemplo A. Los miembros de colonización (8) también pueden tener forma cuadrada o rectangular (8b) como se muestra en el ejemplo B.
- 50 El miembro alargado (3) del ejemplo C incluye una pluralidad de miembros de colonización de forma cilíndrica (8c). Los miembros de colonización de forma cilíndrica (8c) se acoplan al miembro alargado (3) a través del eje central de cada cilindro. En un aspecto, cada miembro de colonización de forma cilíndrica (8c) puede comprender tres superficies de colonización, que incluyen dos superficies de colonización planas que son las caras extremas de cada cilindro. Por tanto, se proporcionan las superficies de colonización sin interrupción. El ejemplo C no forma parte de la invención.
- 55 El miembro alargado del ejemplo D incluye un único miembro de colonización de forma cilíndrica (8d). El miembro de colonización (8d) se acopla al miembro alargado (3) a través del eje central del cilindro. El único miembro de colonización de forma cilíndrica está abierto en ambos extremos. El miembro de colonización (8d) está perforado o formado por una malla. Esto ayuda al acceso de las larvas de ascidias hasta la superficie interna del cilindro, promoviendo así el asentamiento sobre la superficie interna. En un aspecto, se puede proporcionar tres superficies de colonización sin interrupción, que incluyen dos superficies de colonización planas que son las caras extremas de cada cilindro. El ejemplo D no forma parte de la invención.
- 60 El miembro alargado del ejemplo E incluye una pluralidad de miembros alargados (3) y una pluralidad de miembros de colonización (8e). Cada miembro alargado (3) se acopla al borde de cada miembro de colonización (8e). Los
- 65

miembros alargados (3) se separan equitativamente alrededor del borde de cada miembro de colonización (8e) para mantener la forma plana de los miembros de colonización (8e). Un número de miembros de colonización de forma rectangular (8e) se muestran en el ejemplo E. Los miembros de colonización descritos en el presente documento, que incluyen las superficies o miembros de colonización que se extienden radialmente están hechos preferentemente de plástico, preferentemente PVC. Preferentemente están hechos de un plástico o material plástico, por ejemplo, acrílico (Perspex), polipropileno, polibutileno, polietileno de alta densidad o PVC.

Preferentemente, las superficies de colonización son más oscuras que blancas y preferentemente no reflejan la luz. Preferentemente, las superficies de colonización son negras o gris oscuro. Se ha encontrado que mediante el empleo de las superficies de colonización que tienen un color que tienen bajo contraste con el mar, ocurre una bioincrustación menos competitiva.

Preferentemente, la superficie de colonización está formada por un material plástico, es de color oscuro y es una superficie plana horizontal. La estructura submarina define una región submarina tridimensional dispuesta para soportar la colonización de ascidias. Preferentemente, la estructura submarina comprende entre 5.000 y 15.000 miembros alargados. Preferentemente, los miembros alargados tienen una longitud entre 5 y 70 m y más preferentemente los miembros alargados tienen una longitud entre 5 y 50 m. En una realización, los miembros alargados tienen una longitud entre 10 y 70 m, En otra realización, tienen una longitud entre 15 y 25 m, y en otra realización, tienen una longitud de 20 m. En una realización, los miembros alargados tienen una longitud de 5 a 20 m. En una realización, los miembros alargados tienen una longitud de 5 a 10 m. Preferentemente, los miembros alargados se separan una distancia de 0,5 m a 4 m, más preferentemente, 1 a 1,5 m. Preferentemente, una estructura submarina ocupa un área de superficie oceánica de entre 5.000 m² y 1.000.000 m² (100 hectáreas). Preferentemente, una estructura submarina ocupa un área de superficie oceánica de entre 5.000 m² y 20.000 m². Preferentemente, una estructura submarina ocupa un área de superficie oceánica de entre 10.000 m² y 1.000.000 m² (100 hectáreas). Preferentemente, la estructura submarina ocupa un área de 10.000 m² (una hectárea).

La cosecha se puede realizar raspando las ascidias de las superficies de colonización o usando succión al vacío. La cosecha se puede realizar con la estructura submarina in situ, por ejemplo, usando una manguera al vacío extendida desde una embarcación. La cosecha in situ se puede realizar también usando un vehículo operado remotamente (ROV) para cosechar las ascidias de las superficies de colonización. En una escala inferior, se puede llevar a cabo la cosecha, por ejemplo, en una embarcación después de que los miembros alargados se hayan retirado del agua sobre dicha embarcación.

Preferentemente, las ascidias se cosechan cuando son mayores que 10 g en peso, más preferentemente, cuando son mayores que 20 g en peso (húmedo), e incluso más preferentemente, cuando son mayores que 30 g en peso.

Los presentes estudios sugieren una tasa de crecimiento de ascidias de $M = (1 \times 10^{-13}) \times D^{6,41}$, donde M es la masa en gramos y D es el tiempo en días. Basándose en esto, un periodo de despliegue de 6 meses producirá ascidias de aproximadamente 31 g de peso en húmedo (o 1,37 g de peso en seco). Los presentes estudios también muestran que una selección continua de larva para la estructura submarina desde marzo hasta final de agosto en aguas templadas a frías, y que las ascidias permanecen en las estructuras durante al menos 6 a 9 meses. Existen por lo tanto dos estrategias de cosecha distintas. La primera, un despliegue de 5 a 6 meses de la estructura submarina. La segunda es una cosecha continua (10 meses) con despliegues de los miembros alargados desde marzo hasta agosto y la cosecha desde agosto hasta mayo. En la última estrategia de cosecha, se cosechan las ascidias que han sido cultivadas durante 5-9 meses que dará como resultado un aumento del rendimiento de la biomasa total.

Los criaderos de tunicados de la presente invención deberían colocarse en el mar. Preferentemente, aunque no exclusivamente, deberían colocarse en aguas ricas en nutrientes. Los criaderos pueden colocarse tanto en alta mar como en las áreas costeras. Preferentemente, aunque sin restricción, los criaderos se colocan en las áreas costeras, fiordos, áreas de bahía y estuarios.

Las ascidias se conocen por ser filtradores eficaces, es decir, alcanzan su alimento pasando agua a través de un filtrador que retiene las partículas de alimento libremente suspendidas en el agua. En masas de agua con una gran entrada de nutrientes de, por ejemplo, aguas residuales y actividades agrícolas (terrestres y acuicultura), el fitoplancton utilizará este exceso de carga de nutrientes para formar grandes floraciones (es decir, aumentar sus tasas de crecimiento). Esto se denomina eutroficación y al morir el exceso de floraciones de algas, la degradación de estas partículas reducirá el oxígeno en el agua, conduciendo a una reducción de la biodiversidad en este ecosistema. Los nutrientes se unen al fitoplancton y cuando las ascidias comen el fitoplancton para crecer, y cuando se eliminan y usan para biocombustible, los nutrientes se eliminan de las aguas y en consecuencia reducirán el efecto de la eutroficación de un ecosistema. Por lo tanto, los criaderos de ascidias pueden usarse ventajosamente para fines de mejoramiento en áreas con grandes entradas de nutrientes procedentes de actividades humanas. Preferentemente, el método de cría de ascidias divulgado en el presente documento es también un método para reducir el efecto de eutroficación del mar. Preferentemente, el método de cría de ascidias como se divulga en el presente documento implica colocar la estructura submarina en una región del mar sometida a eutroficación o a una carga de nutrientes elevada.

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para producir un biocombustible a partir de ascidias según se describe en el presente documento que comprende las etapas de:

- (a) colonizar superficies de una estructura submarina con ascidias; y
- (b) cosechar dichas ascidias de dicha estructura,

en donde dicha estructura comprende una pluralidad de miembros alargados y define una región submarina tridimensional dispuesta para soportar la colonización de tunicados y, además, en donde la pluralidad de miembros alargados comprende al menos un miembro de soporte alargado y una pluralidad de miembros de colonización, en donde cada miembro de colonización está acoplado a dicho miembro de soporte y comprende al menos una superficie de colonización plana y horizontal que es uniforme y sin interrupción y está en la forma de un plato o disco.

En un aspecto de la divulgación se proporciona un método para producir un biocombustible a partir de una ascidia según se ha descrito anteriormente, método que comprende un método de cría de dicha ascidia de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Ventajas

Hay muchas ventajas en la utilización de ascidias como una fuente de biomasa para la producción de los biocombustibles como se describe en el presente documento. Estas incluyen: (i) tienen tasas de crecimiento muy elevadas que resultan en una gran producción de biomasa anual; (ii) son relativamente fáciles de cultivar y cosechar; (iii) no requieren un terreno cultivable para el crecimiento y, por tanto, no compiten con los cultivos alimentarios terrestres; (iv) contienen cantidades significativas de azúcares C_6 (para etanol) y ácidos grasos (para biodiésel); (v) la extracción de azúcar y aceites es más fácil a partir de la biomasa derivada de ascidias que de la madera; (vi) las ascidias tendrán un efecto de mejoramiento en las aguas eutróficas ya que son filtradoras y capaces de eliminar grandes cantidades de algas; (vii) se pueden cosechar in situ en el océano, una ventaja más importante en comparación con, por ejemplo, las algas modificadas genéticamente que tienen que ser cultivadas en biorreactores que se someten a regulaciones estrictas con respecto a la manipulación y gestión de desechos; (viii) las instalaciones de cultivo de las ascidias proporcionarán posibilidades de arrecife excelentes para la selección de peces locales; (ix) son respetuosas con el medioambiente ya que tienen un bajo impacto con el medioambiente.

La presente divulgación se describe además mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 - Secado del tunicado

Etapas 1 Materia prima - secado

Etapas 1A

4 kg de muestra fresca se obtuvieron raspando ascidias (*C. intestinalis*) que se asentaron en una cuerda unida a un sistema de palangre. Esta materia prima se colocó en una cesta de PVC rectangular con una rejilla en la parte inferior (anchura x longitud x altura = 22 cm x 52 cm x 25 cm) que tiene un marco de aluminio y patas de 4 cm. La materia prima se sometió a presión colocando un plato de PVC en la parte superior de la materia prima y colocando un peso de 12 kg en la parte superior del plato de PVC. Esto corresponde a una presión de 10 g/cm². La materia prima se presiona durante la noche. Después de esta etapa de presión, la muestra pesó 2,65 kg, es decir, 66,2 % en peso del peso en húmedo inicial de 4 kg. La muestra se extiende después entre capas de periódico sobre un suelo caliente durante aproximadamente 24 horas. El periódico se renovó 3 a 4 veces durante este periodo. Este procedimiento produjo una muestra en "húmedo" que pesaba 350 g, es decir, 9 % en peso del peso en húmedo inicial de 4 kg. Un proceso de secado final se realizó usando un horno durante 30 - 60 minutos a 130-150 °C y esto produjo una muestra "seca" que pesaba 175 g, es decir, 4 % en peso del peso en húmedo inicial de 4 kg. La muestra "húmeda" tuvo un contenido de sequedad del 39 % y la muestra "seca" tuvo un contenido de sequedad del 89 %. El contenido de sequedad se calculó después de secar la muestra por calentamiento por infrarrojos a 105 °C hasta que se alcanza un peso constante y se iguala el porcentaje en peso del material seco resultante basándose en el peso en húmedo del material de tunicado antes del secado.

Etapas 1B

También se empleó un procedimiento de secado alternativo. Esto implicó el uso de 3 vasos de precipitados Camwear® (Cambro), dos de 12 l y uno de 18 l como sistemas colectores de presión/agua. Uno de los dos vasos de precipitados de 12 l tenía orificios perforados en la parte inferior. 2,8 kg de ascidias se colocaron en el vaso de precipitados de 12 l perforado y se dejaron drenar sin presión durante 2 horas. Se recogió el agua en el segundo vaso de precipitados de 12 l que estaba situado debajo del vaso de precipitados de 12 l perforado. 5 l de agua se vertieron en un vaso de precipitados de 18 l y se colocó en la parte superior de las ascidias en el vaso de precipitados de 12 l durante 3-4 horas. Para aumentar gradualmente la presión, otros 10 l de agua se añadieron al vaso de precipitados de 18 l. Esto corresponde a una presión final de 28 g/cm². Las ascidias se mantuvieron bajo esta presión durante la noche. Como

resultado, 1,2 l de agua se drenaron de los 2,8 kg iniciales de materia prima. Por último, la muestra se secó en un horno a 130-150 °C durante 2-3 horas.

Ejemplo 2 - Análisis composicional del tunicado

5

Etapa 2 Análisis de la composición

La muestra seca de la etapa 1A se analizó para:

- (i) el contenido de cenizas (compuesto inorgánico) (este se midió por combustión y con el uso de espectroscopia de FTIR (infrarrojos por transformada de Fourier));
- (ii) el contenido de CaCO₃ (este se midió por la emisión de CO₂ después del tratamiento con ácido);
- (iii) el contenido de lignina (este se determinó mediante el número kappa por el método expuesto en Li, J.; Gellerstedt, G., "Kinetics and mechanism of kappa number determination." Nordic Pulp Pap. Res. J. (1998), 13(2), 147-152) y la determinación de lignina Klason por el método de la norma de Tappi, T 222 om-02); y
- (iv) el contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos (esto se determinó por el método estándar descrito en el método de la Asociación de químicos analíticos oficiales (AOAC) 983.23 y la Farmacopea europea "2.4.22. Composición de ácidos grasos por cromatografía de gases")

10

Los resultados fueron:

Ceniza:	47 % en peso (por tanto, 53 % en peso de la muestra se compone por compuestos orgánicos), principalmente silicatos.
CaCO ₃ :	~1,6 % en peso
Sustancias de tipo lignina:	6,3 % en peso (número kappa) y 7,2 % en peso (lignina klason)
contenido de lípidos:	1,7-3,2 %
Composición de ácidos grasos:	véase la figura 1.

Ejemplo 3 - Extracción de celulosa de los tunicados

15

Etapa 3 Preparación de microfibrillas de celulosa

Las microfibrillas de celulosa se prepararon a partir de una muestra seca de materia prima obtenida en la etapa 1 A. La muestra seca se sometió a hidrólisis ácida seguido de la hidrólisis alcalina/elaboración de pulpa Kraft, seguido de oxidación y blanqueamiento.

20

Hidrólisis ácida: 20 g de muestra seca se añadieron a 200 ml de 0,9 % en peso de H₂SO₄ y se calentaron a 180 °C durante 2 horas. El resto remanente se filtró y se lavó y se secó a 50 °C.

25

Hidrólisis alcalina/elaboración de pulpa Kraft: El producto seco obtenido anteriormente se añadió a 100 ml de 9/3 % en peso de solución de NaOH / Na₂S y se calentó a 180 °C durante 2 horas. El resto remanente se filtró y se lavó y después se secó a 50 °C.

30

Oxidación y blanqueamiento: El producto seco después del tratamiento alcalino anterior se añadió a 100 ml de 2,9 % en peso de solución de NaOCl y se calentó a 75 °C durante 1 hora seguido de filtración, lavado y secado a 50 °C. Se obtuvo celulosa pura (Figura 5(i)) a un rendimiento de 3,6 % en peso basándose en el peso del material de partida, es decir, la muestra seca de la materia prima obtenida en la etapa 1 A. El análisis de azúcar muestra que contiene glucosa en una cantidad mayor que el 80 % en peso como el único azúcar neutro. Esto se determinó de acuerdo con la norma de Tappi TAPPI T 249 cm-09 "Composición de carbohidratos de madera extractiva libre y pulpa de madera" modificada por que la hidrólisis ácida de la celulosa se realizó a 120 °C durante una hora en vez de 100 °C durante cuatro horas.

35

El rendimiento de la etapa de hidrólisis ácida fue del 21 % en peso de la muestra seca, el rendimiento de la etapa de hidrólisis alcalina/elaboración de pulpa Kraft fue del 33 % en peso (basándose en el peso de la muestra de partida seca después de la hidrólisis ácida) y el rendimiento de la etapa de oxidación / blanqueamiento fue 52 % en peso (basándose en el peso de la muestra de partida seca después de la hidrólisis alcalina).

40

La muestra resultante de microfibrillas de celulosa tuvo una viscosidad de 500 dm³/kg, correspondiendo a un grado de polimerización (GP) de 936 (aproximadamente 150 K Dalton). La muestra de microfibrillas de celulosa tuvo una

solubilidad demasiado baja en una solución de LiCl/DMAc para realizar un análisis CET de LiCl / DMAc (un análisis para evaluar el tamaño molecular de un polímero). Esto sugiere que la celulosa obtenida tiene una diferencia estructural distinta de la celulosa de la madera porque la celulosa de la madera es comúnmente soluble en esta solución de LiCl/DMAc. Esto se confirmó también por análisis microscópico. Bajo análisis microscópico, las fibrillas de celulosa obtenidas parecen muy diferentes de las microfibrillas de celulosa de madera, con las últimas siendo más largas, más gruesas y con una forma más uniforme (Figuras 5(i) y (ii)).

Ejemplo 4 - Comparación de condiciones de hidrólisis para la celulosa en los tunicados

10 *Etapa 4 Comparación de las condiciones de hidrólisis de la celulosa*

En este ejemplo, una muestra "húmeda" y una muestra "seca" de la materia prima obtenida en la etapa 1 (véase anteriormente) y una muestra de referencia de celulosa pura (la pulpa disolvente obtenida de madera de abeto) se sometieron a hidrólisis ácida y enzimática.

15 A. Hidrólisis ácida

En cada caso, 1 g de la muestra se sometió a hidrólisis ácida en 40 % de H₂SO₄ (sólido/líquido = 1/10) a 90 °C durante 1 hora. El rendimiento de la hidrólisis resultante para glucosa en la celulosa disponible se determinó de acuerdo con la norma de Tappi TAPPI T 249 cm-09 "Composición de carbohidratos de madera extractiva libre y pulpa de madera" sin la prehidrólisis de la muestra:

Muestra de referencia 3,6 % en peso

Muestra seca 6,6 % en peso

Muestra húmeda La solución de la muestra "húmeda" se volvió muy viscosa durante la hidrólisis ácida y no se pudo muestrear con precisión para una determinación del contenido de glucosa fiable.

25 B. Hidrólisis enzimática

En cada caso, 1 g de la muestra se sometió a hidrólisis enzimática (sólido/líquido = 1/30) usando Novozymes 342 (un producto enzimático comercial de Novozymes, que contiene endoglucanasa, exoglucanasa y β-glucosidasa) a 40 °C durante 5 horas a pH 7. El rendimiento de hidrólisis resultante para glucosa en la celulosa disponible fue:

Muestra de referencia 2,0 % en peso

Muestra seca 1,0 % en peso

Muestra húmeda 3,5 % en peso

Aunque la muestra "húmeda" se hidrolizó más rápido, se observó un efecto inhibitor de la muestra "húmeda" para la hidrólisis enzimática. La actividad de la glucosidasa se dificultó parcialmente y como resultado, se detectó una cantidad sustancial de celubiosa en el producto a partir de la hidrólisis de la muestra "húmeda". No se detectó ninguna celubiosa en el producto a partir de la hidrólisis de la muestra de referencia o de la muestra seca.

35 Ejemplo 6 - Producción de biodiésel

(A) Extracción de lípidos del tunicado y la transesterificación de los lípidos extraídos

40 (i) Extracción de lípidos del tunicado seco.

Una muestra del tunicado se liofilizó. 106 gramos del tunicado seco se sometieron a extracción en un equipo Soxhlet usando 800 ml de éter de petróleo (30-60 °C) durante 6 horas. El producto resultante se filtró para separar la solución (filtrado) a partir del material de tunicado sólido. El filtrado se evaporó al vacío usando un evaporador giratorio. 3,2 gramos de lípidos se obtuvieron (3 % en peso de rendimiento basándose en el peso del tunicado seco).

(ii) Transesterificación de los lípidos extraídos - catalizado con base

50 mg de KOH se añadieron a 20 ml de metanol bajo agitación vigorosa. La solución obtenida se añadió después a 1 gramo de los lípidos obtenidos en la etapa anterior. La mezcla se calentó a reflujo y se mantuvo bajo reflujo durante 4 horas. Después, la mezcla se enfrió y se dejó reposar. Después de lo cual, se separó la capa superior y se evaporó al vacío usando un evaporador giratorio. Después, se añadió agua (10 ml) seguido de la adición de 10 ml de CH₂Cl₂. Después de agitar vigorosamente y después del reposo, se separó la capa inferior y se evaporó y se obtuvieron 0,7 gramos de biodiésel. Si se multiplica esto iguala un rendimiento del 2,1 % en peso de biodiésel basándose en el peso del tunicado seco.

(B) Transesterificación del tunicado seco - catalizado con ácido

Una muestra del tunicado se liofilizó. 10 gramos del tunicado seco se suspendieron en 200 ml de metanol que contenían H₂SO₄ 0,2 M. La mezcla se calentó a reflujo durante 10 horas, tiempo durante el cual se agitó bien. La suspensión se enfrió, se centrifugó y la solución se evaporó. El resto obtenido se añadió a 10 ml de agua. Se añadieron también 10 ml de CH₂Cl₂. Después de agitar vigorosamente la mezcla, se dejó reposar. La capa inferior se separó y se evaporó y se obtuvieron 0,16 gramos de biodiésel (1,6 % en peso de rendimiento de biodiésel basándose en el peso del tunicado seco).

Ejemplo 7 - Método de cría

Una estructura submarina se montó en aguas marinas cerca de Bergen en el mes de mayo. La estructura comprendió los siguientes elementos que se fijaron a un sistema de palangre que sujetó los elementos entre las profundidades de - 4 y -20 m por debajo del nivel del mar:

- (i) cilindros de PVC grises huecos (cada uno teniendo un diámetro de 40 cm y una longitud de 50 cm) fijados a una cuerda, se colocaron en cada metro a lo largo de la cuerda;
- (ii) platos de PVC grises rectangulares (cada uno teniendo una longitud de 50 cm y una anchura de 34 cm) fijados a una cuerda, se colocaron en cada metro a lo largo de la cuerda;
- (iii) una cuerda negra con un diámetro de 1,2 cm (Cuerda de Polysteel de 3 cabos, multifilamento de polipropileno al 100 %, 12 MM, Bilteama); y
- (iv) una cuerda verde con un diámetro de 2 cm (Cuerda de Polysteel de 3 cabos DANLINE 20 MM, AS Fiskevegn).

(ii) forma parte de la invención. (i), (iii) y (iv) no forman parte de la invención.

Tres meses después, las ascidias (*Ciona intestinalis*) se cosecharon de la estructura submarina tirando las cuerdas (incluyendo aquellas con los cilindros y los platos unidos) sobre una embarcación y raspando manualmente las ascidias. La biomasa recogida en cada metro de cuerda se registró y después se calculó como una función del área superficial. Los resultados se muestran en las figuras 8 y 9. En estas figuras la biomasa en kg por metro² se muestra como una función de la profundidad (m).

Los resultados muestran que la biomasa por metro² fue significativamente superior en las cuerdas con platos unidos en comparación con otras cuerdas. Los platos generaron un promedio de 22,2 kg por m², en comparación con 4,8 kg sobre los cilindros, 4,6 kg sobre las cuerdas negras y finalmente 1,2 kg sobre las cuerdas verdes. Los platos usados en este experimento generaron un promedio de 9690 individuos por m², los cilindros generaron 3106 individuos/m², mientras que las cuerdas negras y verdes generaron 1645 y 529 individuos por m², respectivamente.

Las cuerdas negras produjeron una biomasa superior por metro² que las cuerdas verdes, demostrando que la superficie más oscura favorece la colonización y el asentamiento de las ascidias.

Asimismo, fue claro para el ojo que las estructuras del plato y del cilindro generaron una colonización muy homogénea de *Ciona intestinalis* con una bioincrustación mucho menor por otros organismos, en comparación con las cuerdas negras y verdes.

Referencias

1. Matthyse AG, Deschet K, Williams M, et al. (2004). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101 (4): 986-991.
2. Matthyse AG, Deschet K, Williams M, Marry M, White AR, Smith WC (2004). A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (4): 986-991.
3. Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, et al. (2006). *Nature*. 439(7079): 965-968.
4. Satoh N, Satou Y, Davidson B, et al. (2003). *Trend in Genetics*. 19(7): 376-381.
5. Dybern BI (1965). *Oikos* 16: 109-131
6. Swane I, Havenhand JN (1993). *Marine Ecology* 14(1): 53-66
7. Sasakura Y., K. Nakashima, S. Awazu, et al. 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 102: 15134-15139

8. Nakayama-Ishimura A, Chambon J-P, Horei TK, Satoh N, Sasakura Y (2009). *Dev. Biol.* 326: 357-367
- 5 9. Kimura, S., e Itoh, T. (1998). *Protoplasma* 204, 94-102
10. Li J, Lennholm H, Henriksson G, Gellerstedt G (2000a). 13^{er} Simposio internacional de alcohol combustible (ISAF XIII) (Estocolmo, 3-6 de julio de 2000), procedimientos (Vol. I), Número 6
- 10 11. Li J, Lennholm H, Henriksson G, Gellerstedt G (2000b). 1^a Conferencia mundial y exhibición sobre la biomasa para energía e industria (Sevilla, 5-9 de junio de 2000), procedimientos, 767-770
12. Li J, Lennholm H, Henriksson G, Gellerstedt G (2001). 7^o Simposio brasileño de química de ligninas y otros componentes de la madera, (Belo Horizonte, 3-5 de septiembre de 2001), procedimientos, 423-430
- 15 13. Li J, Lennholm H, Henriksson G, Gellerstedt G (2002). 2^o Simposio internacional sobre tecnologías emergentes de la elaboración de pulpa y de la fabricación de papel, (Guangzhou, 9-11 de octubre de 2002), procedimientos, 82-90
- 20 14. Lin Y, Tanaka S (2005), *Appl. Microb Biotech* 69(6): 627-642
15. Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, et al. (2006). *Trends in Biotechnology* 24(12): 549-556
16. Carver CE, Chisholm A, Mallet AL (2003). *J. Shellfish res.* 22(3): 621-631.
- 25 17. Howes S, Herbinge CM, Darnell P, et al (2006). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342(1): 85-92.
18. Sanderson K (2006). A field in ferment. *Nature.* 444(7120): 673-676.
- 30 19. Kolomaznik K, Klein K, Vasek V, et al (2009). Sol. Int., WO 2009089802

REIVINDICACIONES

1. Un método de cría de ascidias que comprende las etapas de:

- 5 (a) colonizar superficies de una estructura submarina con ascidias; y
 (b) cosechar dichas ascidias de dicha estructura,

10 en donde dicha estructura comprende una pluralidad de miembros alargados y define una región submarina tridimensional dispuesta para soportar la colonización de tunicados y, además, en donde la pluralidad de miembros alargados comprende al menos un miembro de soporte alargado y una pluralidad de miembros de colonización, en donde cada miembro de colonización está acoplado a dicho miembro de soporte y comprende al menos una superficie de colonización plana y horizontal que es uniforme y sin interrupción y en la forma de un plato o disco.

15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la pluralidad de miembros alargados comprende al menos un miembro alargado que soporta una pluralidad de superficies o miembros de colonización que se extienden generalmente radialmente.

20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las superficies o miembros de colonización que se extienden generalmente radialmente tienen forma de disco o rectangular.

4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las superficies o miembros de colonización son más oscuros que blancos.

Figura 1

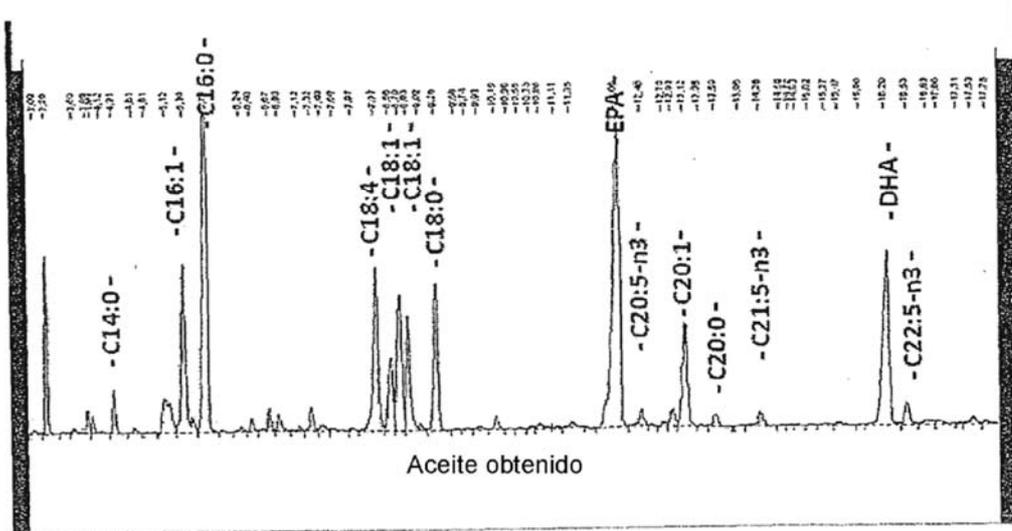


Figura 2

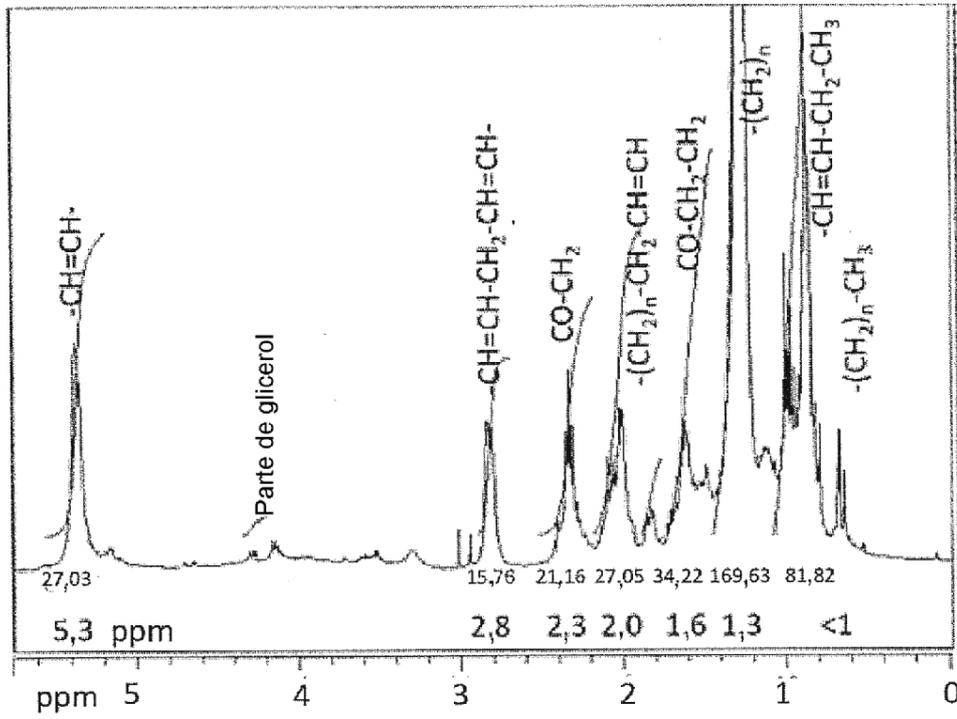


Figura 3

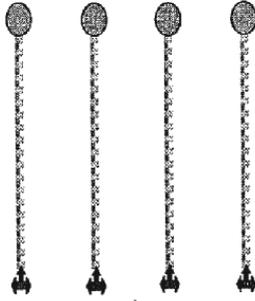


Figura 4



Figura 5

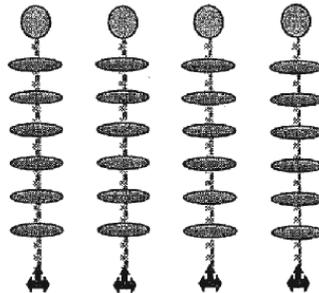
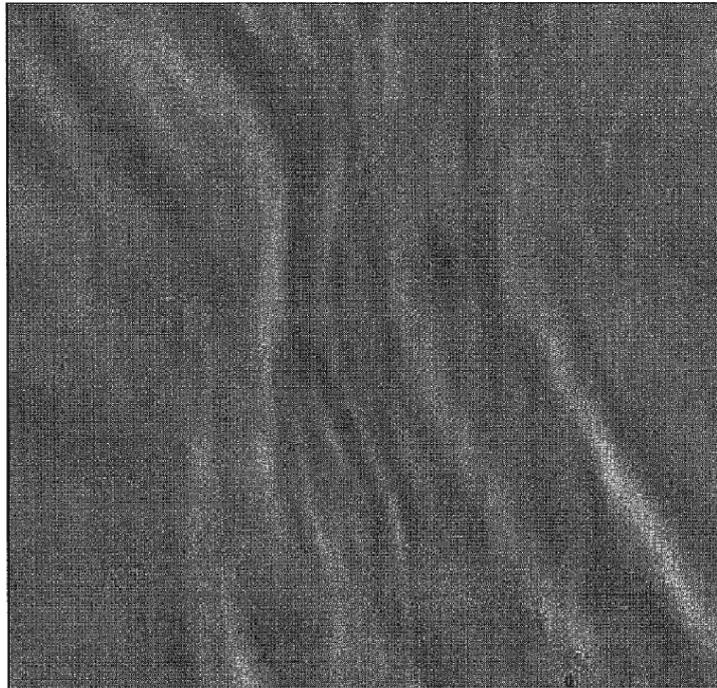


Figura 6

(i)



(ii)

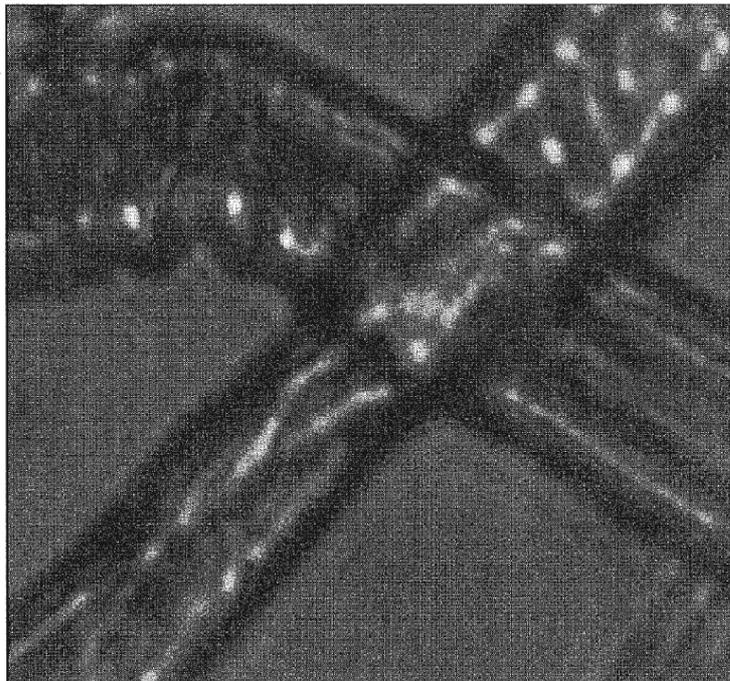


Figura 7

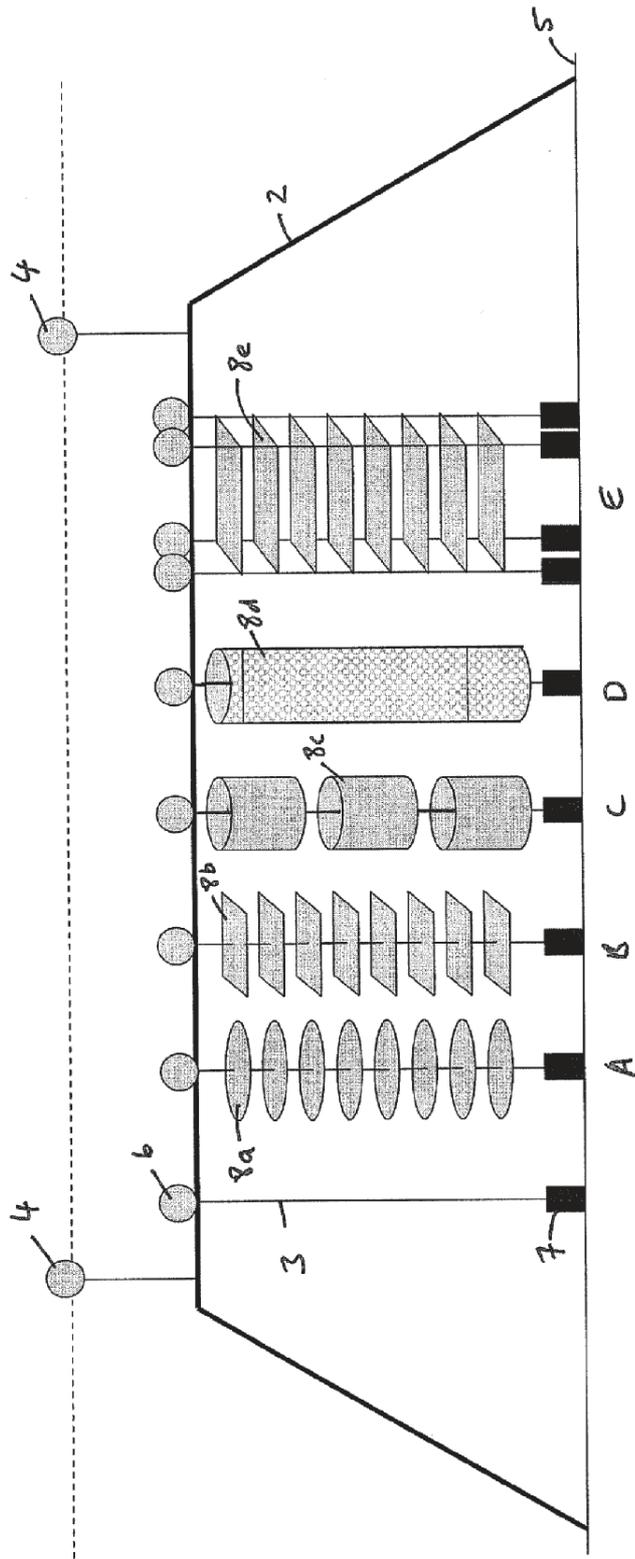


Figura 8

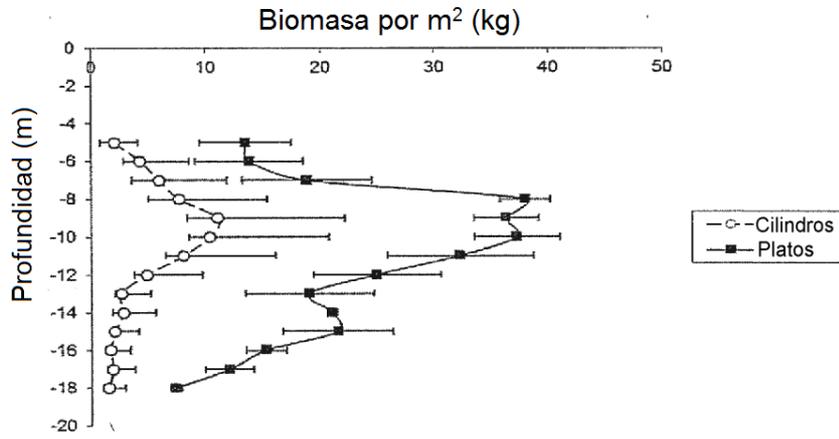


Figura 9

