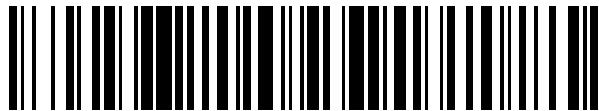


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 451**

21 Número de solicitud: 201530894

51 Int. Cl.:

C12P 7/08 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

23.04.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.10.2016

Fecha de la concesión:

07.02.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.02.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT D'ALACANT / UNIVERSIDAD DE
ALICANTE (100.0%)**

**Crta. San Vicente del Raspeig, s/n
03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

LÓPEZ LLORCA, Luis V.;
ARANDA MARTÍNEZ, Almudena y
NARANJO ORTIZ, Miguel Ángel

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **Procedimiento para la producción de bioetanol a partir de quitosano mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisoplia***

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de etanol a partir de una fuente de quitosano que comprende el uso de *Metarhizium anisopliae* y al uso de dicho hongo para la degradación de residuos marisqueros, obteniendo además biomasa fúngica para su uso agrobiotecnológico.

ES 2 587 451 B2

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE QUITOSANO MEDIANTE EL USO DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *METARHIZIUM ANISOPLIA*

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se encuadra, en el campo de la biotecnología en general, y en particular, se refiere a un procedimiento para la producción de bioetanol a partir de quitosano mediante el uso de *Metarhizium anisopliae*.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 La creciente búsqueda de técnicas de producción de biocombustibles es un campo estratégico para muchos países, debido a la problemática que genera la dependencia de combustibles derivados del petróleo. Aunque el petróleo sea una fuente energética con cualidades intrínsecas como su extracción, buena transportabilidad, versatilidad y bajo costo, se trata de un producto obtenido de la transformación de la biomasa a lo largo de 200 millones de años y su cantidad es finita. La disminución en las reservas de petróleo y el
15 aumento de su precio desde 2005 explican las nuevas políticas que han generado un aumento continuo sostenido de la demanda de biocombustibles como sustituto (Wright, B. (2014). Global Biofuels: Key to the Puzzle of Grain Market Behavior. Journal of Economic Perspectives, 28(1), 73–98. doi:10.1257/jep.28.1.73).

- 20 El término biocombustible se refiere a los combustibles líquidos o gaseosos, que se producen a partir de biomasa. En 2006, los biocombustibles líquidos representaron aproximadamente el 1% de la energía mundial renovable. Sin embargo, ese escenario se ha transformado muy rápidamente en la mayoría de los grandes países consumidores de energía, que están adoptando políticas que favorezcan una mayor utilización de biocombustibles en la próxima década. En la actualidad, los únicos biocombustibles
25 producidos y utilizados en gran escala en el mundo son el etanol y biodiesel. En concreto, el etanol es el biocombustible más utilizado. Los datos sobre la producción de etanol revelan importantes tendencias de expansión. En concreto, Estados Unidos la producción total de ese biocombustible en el año 2011 fue de unos 52617 millones de litros, mostrando un incremento del 4,5% respecto al año anterior. EIA (2012).

- 30 En la actualidad, la producción de biocombustibles se basa mayoritariamente en la fermentación de materia vegetal con alto contenido en azúcares por parte de levaduras, especialmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras poseen una gran

capacidad de crecimiento en condiciones fermentativas, toleran altas concentraciones de sustrato y son altamente resistentes al etanol que ellas mismas producen (Sánchez, O. J., & Cardona, C. a. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270–95. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013).

- 5 Sin embargo, la utilización de materia prima vegetal para la obtención de biocombustibles supone serios problemas económicos, sociales y medioambientales debidos al incremento necesario de superficie cultivada para este fin. La alta demanda de combustibles supondría la necesidad de incrementar enormemente el esfuerzo agrícola a fin de producir suficiente materia prima, con el coste económico y medioambiental que implicaría tal incremento en la
- 10 superficie cultivable. Por otro lado, la utilización de cultivos de consumo para la producción de biocombustibles implica el riesgo social y económico de que la demanda de tales productos afecte al precio de los alimentos.

Para solucionar dicha problemática, la investigación en el desarrollo de biocombustibles está dirigida a la búsqueda de sustratos alternativos a los cultivos. Idealmente, dichos sustratos

15 deberían generar una productividad elevada, un rendimiento alto del biocombustible así como de la materia prima, y a un coste competitivo evitando así, el uso de cultivos. En este sentido, el uso de sustratos derivados de residuos agroforestales, industriales o pesqueros reviste gran interés, suponiendo a su vez, un tratamiento alternativo de los mismos aprovechando el potencial de éstos como materia prima de otros procesos. Sin embargo, la

20 mayoría de residuos disponibles no son fácilmente utilizables por las levaduras lo que hace necesario la utilización de pre-tratamientos que complican el proceso de producción de biocombustibles incrementando los costes. Dichos pre-tratamientos consisten normalmente en la digestión del sustrato hasta un estado asimilable por el microorganismo (Ej. obtención de glucosa a partir de celulosa por digestión enzimática), y pueden ser de naturaleza

25 química, enzimática o biológica. Son esencialmente una predigestión por otros organismos en un sistema multifásico.

La quitina es un β -1,4-glucano formado por unidades de N-acetilglucosamina. Este biopolímero es uno de los más abundantes del planeta formando parte del exoesqueleto de invertebrados, principalmente artrópodos, moluscos y nematodos (Rabea EI, Badawy ME,

30 Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4:1457–65) y en la pared celular de las hifas de los hongos verdaderos. Los residuos marisqueros (fundamentalmente de crustáceos marinos) son una fuente abundante de quitina. El elevado contenido en nitrógeno de estos residuos los hace agentes altamente eutrofizantes. Su eliminación incontrolada causa importantes

problemas ambientales, fundamentalmente por la acumulación de aminas y otros compuestos nitrogenados (Kandra, P., Challa, M. M., & Jyothi, H. K. P. (2012). Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 17–29. doi:10.1007/s00253-011-3651-2).

- 5 Los derivados de quitina, especialmente la quitina parcialmente desacetilada (quitosano) poseen actividad antimicrobiana. En la actualidad el quitosano es un compuesto con un enorme potencial, del que se han descubierto diferentes aplicaciones, logrando importantes avances tanto en medicina como en agricultura. El quitosano posee características como agente antimicrobiano por su actividad bactericida y fungicida, actuando como agente
- 10 desestabilizante de membranas (Palma-Guerrero, J., Huang, I.-C., Jansson, H.-B., Salinas, J., Lopez-Llorca, L. V, & Read, N. D. (2009). Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genetics and Biology*, 46(8), 585–94. doi:10.1016/j.fgb.2009.02.010). Una limitación para su uso como materia prima de combustibles es que los organismos fermentadores tradicionales tales
- 15 como *Saccharomyces cerevisiae* son sensibles a quitosano e incapaces de usar quitina, quitosano, o incluso los monosacáridos componentes de los mismos (N-acetilglucosamina y glucosamina), como única fuente de carbono y nitrógeno. Por ello, es necesario diseñar estrategias para su aprovechamiento que disminuyan los impactos negativos medioambientales.
- 20 Así pues, sería interesante disponer de un agente productor de etanol a partir de quitosano procedente de residuos de la industria marisquera u otras fuentes de quitina o quitosano, de tal forma que, por un lado se proporcionara un procedimiento para la producción de etanol alternativo al uso de cultivos o residuos agroforestales y por otro lado, supusiera una forma de eliminar la contaminación producida por los residuos marisqueros. Además el proceso
- 25 generaría biomasa fúngica para su uso agrobiotecnológico.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona la solución a los problemas anteriormente expuestos por medio de la utilización del hongo *Metarhizium anisopliae* como organismos productores de

30 etanol a partir de quitosano.

Así pues en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de bioetanol (de aquí en adelante procedimiento de la presente invención) a partir de una fuente de quitosano que comprende el uso de *Metarhizium anisopliae*.

En la presente invención por fuente de quitosano se entiende a cualquier producto que comprenda quitosano, quitina o derivados de ambos productos.

5 En un aspecto particular de la presente invención, la fuente de quitosano utilizada en el procedimiento de la presente invención es quitosano, quitina o productos derivados de los mismos.

En una realización particular de la presente invención, la fuente de quitosano proviene de residuos marisqueros.

10 En una realización particular de la presente invención, el hongo se encuentra en una concentración tal que permita el crecimiento mínimo necesario para realizar el procedimiento de la presente invención sin que se produzcan el fenómeno de autoinhibición del crecimiento. Más en particular, el hongo se encuentra en una concentración comprendida entre 10^4 - 10^7 esporas/ml.

15 En la presente invención por esporas se refiere a conidios, clamidosporas o cualquier tipo de inóculo fúngico manejable y cuantificable que genere fácilmente crecimiento rápido y abundante de la especie productora de dicho inóculo.

En una realización particular, el procedimiento de la presente invención comprende la adición de nutrientes al medio de reacción, tales como PDB (Caldo Patata Dextrosa).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de *Metarhizium anisopliae* para la producción de etanol a partir de quitosano.

20 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de *Metarhizium anisopliae* para la degradación y descontaminación de residuos marisqueros y obtención de biomasa fúngica y bioetanol.

El procedimiento de la presente invención proporcionó las siguientes ventajas:

25 1. *M. anisopliae* presenta la capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de quitosano (más de 2 mg/ml) (Palma-Guerrero et al., 2008) que son tóxicas para otros organismos (ej. *S. cerevisiae*) comúnmente utilizados en la producción de biocombustibles. Esta característica supone, además, una ventaja al reducir la probabilidad de contaminación de los cultivos de *M. anisopliae* para la producción de bioetanol, con otros microorganismos.

30 2. *M. anisopliae* tiene la capacidad de producir una elevada cantidad de azúcares reductores, especialmente en anaerobiosis, en presencia de elevadas concentraciones de quitosano (de hasta 3 mg/ml), que pueden ser, posteriormente, fermentados a etanol.

3. *M. anisopliae* presenta la capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas empleando el quitosano como única fuente de carbono.
4. *M. anisopliae* presenta la capacidad de degradación del quitosano en anaerobiosis, consiguiendo, *M. anisopliae*, una degradación de tal compuesto mayor que en condiciones
5 aerobias.
5. *M. anisopliae* presentan la capacidad de tolerar etanol en el medio de cultivo.
6. *M. anisopliae* presentan en su genoma, alcohol deshidrogenasas dependientes de zinc y piruvato descarboxilasas necesarias para la producción de etanol.
7. *M. anisopliae* presenta la capacidad de producir etanol a partir de quitosano, un
10 residuo abundante de la industria marisquera, cuya fuente principal son los exoesqueletos de los crustáceos, en condiciones anaeróbicas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1. Muestra el crecimiento en medio líquido de *M. anisopliae* con quitosano (0, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 mg ml⁻¹) como única fuente de nutrientes.
- 15 Figura 2. Muestra la capacidad degradadora de quitosano por parte de *M. anisopliae* con distintas concentraciones de quitosano (0.5 y 1 mg ml⁻¹) como única fuente de nutrientes en medio sólido agar-agua (1.5%) en condiciones aerobias y anaerobias. El índice 1-(C/H) representa la capacidad degradadora de quitosano por parte del hongo relativa a su crecimiento relacionando el diámetro del halo de degradación de dicho sustrato (H) respecto
20 al diámetro de la colonia del hongo (C).
- Figura 3. Muestra la apariencia de las colonias de 15 días de *M. anisopliae* creciendo en agar harina de maíz con quitosano en condiciones aerobias o anaerobias. Nótese la zona oscura alrededor de las colonias del hongo que corresponde al halo de degradación de quitosano.
- 25 Figura 4. Muestra la producción de azúcares reductores por parte de *M. anisopliae* durante su crecimiento en medio líquido con de 0, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 mg ml⁻¹ de quitosano en condiciones aerobias.
- Figura 5. Muestra la producción de azúcares reductores por *M. anisopliae* en medio líquido con 0, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 mg ml⁻¹ de quitosano en condiciones anaerobias.
- 30 Figura 6: Muestra el crecimiento de *M. anisopliae* en medio agar-agua (1.5%) suplementado con alcohol (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 10%).

Figura 7: Alineamiento múltiple de genes fúngicos de alcohol deshidrogenasas I con los homólogos predichos en el genoma de *P. chlamydosporia*. Incluye las secuencias de *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Candida albicans* (2 secuencias, presenta una duplicación génica), *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma reseei*, *Claviceps purpurea*, *Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Figura 8: Árbol filogenético para ilustrar las alcohol deshidrogenasas fúngicas incluyendo las predichas en el genoma de *P. chlamydosporia*. El árbol se construyó utilizando las mismas secuencias que en el alineamiento de la Figura 7. Las secuencias de *Arabidopsis thaliana* se han incluido como grupo externo con el fin de enraizar el árbol.

Figura 9: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las Piruvato descarboxilasas de *P. chlamydosporia* con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida albicans* (2 secuencias, presenta una duplicación génica), y las de los hongos filamentosos *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma reseei*, *Claviceps purpurea*, *Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. También se han incluido las de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Figura 10: Árbol filogenético para ilustrar las piruvato descarboxilasas fúngicas incluyendo las predichas en el genoma de *P. chlamydosporia*. El árbol se construyó utilizando las mismas secuencias que en alineamiento de la Figura 9. Las secuencias de *Arabidopsis thaliana* se han incluido como grupo externo con el fin de enraizar el árbol.

Figura 11: Muestra la producción de etanol por *M. anisopliae* en condiciones anaerobias con quitosano (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 3 mg/ml) como única fuente de carbono a los 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días de crecimiento en anaerobiosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN

La presente invención muestra la capacidad de *M. anisopliae* para crecer eficientemente en anaerobiosis utilizando el quitosano como única fuente de nutrientes y de producir etanol a partir de los azúcares productos de la degradación de este compuesto residuo de la industria marisquera.

El quitosano a utilizar en el método de la invención puede generarse por desacetilación química o enzimática de quitina animal o fúngica.

EJEMPLO 1: Crecimiento de *M. anisopliae* en quitosano y degradación de este sustrato como única fuente de nutrientes

Se analizó la capacidad de crecimiento de utilizando quitosano como único nutriente, en medio líquido o sólido. El aislado de *M. anisopliae* usado en los modos de realización de la presente invención, fue la cepa 46 depositada en la CECT con el número de referencia 20928, aislada de *Otiorhynchus sulcatus* (localidad desconocida).

El quitosano empleado, denominado como T8s, fue adquirido a Marine Bioproducts GmbH (Bremerhaven, Alemania). Este quitosano presenta un peso molecular de 70 kDa y un grado de desacetilación del 82.5%. Se preparó para usarse en los experimentos que se detallan a continuación, se prepara una disolución al 1% de quitosano en ácido clorhídrico 0.25M, ajustando el pH a 5.6 con hidróxido de sodio 1M. Esta disolución se somete a diálisis durante 3 días en agua destilada a 4°C para eliminar las sales presentes en el quitosano o las posibles sales formadas en el proceso del ajuste del pH. El quitosano disuelto y dializado se esteriliza mediante calor húmedo en autoclave antes de su uso.

La cepas de *M. anisopliae* se cultivó en placas de Petri con medio de cultivo agar extracto de maíz (CMA) a una temperatura de 25°C y se sembraron cada 30 días. Para los ensayos realizados en líquido, transcurridos entre 20-30 días, los conidios y clamidosporas, se extrajeron en agua destilada estéril y Tween20 al 0.05%. La suspensión de esporas en agua destilada estéril se filtró a través de Miracloth y se cuantificó en una cámara de Neubauer hasta ajustar a la concentración final de 10^6 conidios/ml. Los tratamientos fueron: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 3 mg/ml de quitosano. a continuación se añadió PDB (0.025%) para permitir la germinación de los conidios de estos dos hongos. Una vez preparadas las diluciones de quitosano, se inocularon con conidios de *M. anisopliae* y se cargaron 12 alícuotas de cada tratamiento en una placa multipocillo y se estimó el crecimiento como la absorbancia a 490nm cada 24 h durante 15 días usando el espectrofotómetro Genios™ Multiwell (Tecan Männedorf, Suiza) (Lopez-Moya, F., Colom-Valiente, M.F., Martinez-Peinado, P., Martinez-Lopez, J.E., Puellas, E., Sempere-Ortells, J.M. and Lopez-Llorca L.V. (2015) Carbon and nitrogen limitation increase chitosan antifungal activity in *Neurospora crassa* and fungal human pathogens. Fungal Biology. doi: 10.1016/j.funbio.2014.12.003.).

Con los valores obtenidos se construyeron las curvas de crecimiento para cada uno de los tratamientos, observándose que *M. anisopliae* fue capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones de quitosano como única fuente de nutrientes. (Figura 1).

M. anisopliae es un hongo resistente a quitosano, capaz de degradar este compuesto. Los ensayos de crecimiento de *M. anisopliae*, en medio sólido se realizaron en placas de agar-
 agua (1,5%) suplementadas con quitosano (0, 0.5 y 1 mg/ml) y se inocularon con un
 fragmento de agar con micelio de *M. anisopliae* usando un sacabocados. Se midió
 5 diariamente el halo de crecimiento fúngico así como el halo de degradación de quitosano
 producido por el hongo en aquellas placas que contenían este compuesto. Estos ensayos se
 llevaron a cabo con el objetivo de mostrar las diferencias en el crecimiento y degradación
 entre las condiciones aerobias y anaerobias, por ello, este mismo experimento de
 crecimiento fúngico y degradación de quitosano en placa se realizó en condiciones de
 10 anaerobiosis, tomando las medidas cada 4 días. Para alcanzar tales condiciones se
 dispusieron las placas en jarras de anaerobiosis (Oxoid) empleando el sistema de
 generación de atmósfera anaerobia “AnaeroGen” (Oxoid). Se observó la capacidad de
 crecimiento *M. anisopliae* en anaerobiosis y la degradación de quitosano que fue mayor que
 la observada en condiciones aerobias, (Figura 2).

15 **EJEMPLO 2: Producción de azúcares reductores por parte *M. anisopliae* en presencia de quitosano**

Con el objetivo de medir la producción de azúcares reductores por parte de *M. anisopliae* en
 presencia de distintas concentraciones de quitosano, se prepararon matraces de 100 ml con
 20 ml de quitosano disuelto en agua a las siguientes concentraciones: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2
 20 y 3 mg/ml. En estos matraces se inoculó el hongo empleando los conidios extraídos (como
 en el Ejemplo 1) a una concentración final de 10^6 conidios/ml. Estos matraces se incubaron
 en agitación (150 rpm) a 25°C durante 15 días. Cada 24 h se extrajeron muestras de los
 cultivos y se midió la cantidad de azúcares reductores utilizando Ácido dinitrosalicílico (DNS)
 (G. L. Miller (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar,
 25 Anal. Chem. doi: 10.1021/ac60147a030). Para ello, se añadió a 1 ml de muestra, 1 ml de
 solución DNS al 1% y se incubó durante 10 min a 90°C, seguidamente se añadieron 330 µl
 de tartrato de potasio (40%) y tras enfriar la muestra a temperatura ambiente se procedió a
 la lectura de la absorbancia a 595 nm usando el espectrofotómetro Genios™ Multiwell
 (Tecan Männedorf, Suiza). Los resultados de producción de azúcares reductores se
 30 muestran en la figura 4, viéndose que la producción de los mismos se ve aumentada en
 presencia de altas concentraciones de quitosano, sobre todo a las concentraciones de 2 y 3
 mg/ml. De forma similar se midió la producción de azúcares reductores en condiciones de
 anaerobiosis, utilizando el mismo protocolo descrito, tomando las muestras, que en este
 caso se incubaron en las jarras de anaerobiosis, cada 2 días. En la Figura 5, se observa un

incremento en la producción de azúcares reductores en condiciones de anaerobiosis a elevadas concentraciones de quitosano, aunque menor que la observada a dichas concentraciones en condiciones aerobias.

EJEMPLO 3: Crecimiento de *M. anisopliae* en presencia de etanol.

5 Dado que uno de los requerimientos de un organismo productor de etanol es tolerar la presencia de etanol en el medio, se realizó un experimento para ver el crecimiento fúngico en agar-agua al 1.5% suplementado etanol (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 10%). El medio con el etanol se inoculó con *M. anisopliae* como en el Ejemplo 1, utilizando un sacabocados. El crecimiento de los hongos se midió diariamente y se construyeron curvas de crecimiento (Figura 6). *M.*
10 *anisopliae* es capaz de crecer hasta concentraciones de alcohol de 4%..

EJEMPLO 4: Comparación las secuencias de los genes de las Alcohol deshidrogenasas (ADHs) y de las Piruvato descarboxilasas (PDCs) de *P. chlamydosporia*, *B. bassiana* y *M. anisopliae* respecto a las de otros organismos capaces de producir etanol.

15 Se alinearon las secuencias de diversas alcohol deshidrogenasas I y piruvato decarboxilasas descritas mediante un alineamiento múltiple con los genes homólogos predichos en el genoma de *P. chlamydosporia* (Larriba, E., Jaime, M. D. L. a, Carbonell-Caballero, J., Conesa, A., Dopazo, J., Nislow, C., Lopez-Llorca, L. V. (2014). Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia*
20 *chlamydosporia*. Fungal Genetics and Biology, 65, 69–80. doi:10.1016/j.fgb.2014.02.002). El alineamiento (figura 7) incluyó las secuencias de *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma reseei*, *Claviceps purpurea*, *Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. El alineamiento se realizó empleando
25 T-Coffee. El árbol se construyó alineando las secuencias con MAFFT v.7.164. Posteriormente, el alineamiento se depuró utilizando Gblocks v 0.91b. El árbol se construyó empleando un algoritmo de Neighbour Joining, un modelo de sustitución JTT y un bootstrap de 100 (Figura 8). **EJEMPLO 5: Producción de etanol por parte de *P. chlamydosporia*, *B. bassiana* y *M. anisopliae* en presencia de quitosano.**

30 Con el objetivo de comprobar la producción de etanol a partir de *P. chlamydosporia* en condiciones anaeróbicas, se empleó Clorocromato de Piridinio (PCC). El PCC es el reactivo más utilizado en la cuantificación de etanol determinando su oxidación a grupos carbonilo. Se obtuvieron alicuotas de 10 ml de los cultivos aerobios de 5 días de *P. chlamydosporia*, *B.*

bassiana y *M. anisopliae* con quitosano (0-3 mg/ml) como fuente única de nutrientes se pasaron a condiciones de anaerobiosis en placas de Petri de 4.7 cm de diámetro en las jarras de anaerobiosis. Estos cultivos se mantuvieron en agitación suave (100 rpm) y se extrajeron muestras a los 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días para medir la producción de etanol en las mismas, siendo el tiempo 0, el valor antes de incubar los cultivos en un ambiente anaeróbico.

Los medidas con PCC se realizaron extrayendo una alícuota de 0.4 ml del caldo de cultivo que se incubó con 0.4 ml de PCC 1M durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min y se midió la absorbancia a 570 nm del sobrenadante. Los valores obtenidos de absorbancia se transformaron en % de etanol utilizando una recta de calibrado realizada con concentraciones crecientes de etanol ($Abs_{570} = 0,0457 * \%etanol + 0,0116$) obteniendo un ajuste de $R^2 = 0,9974$. Como se muestra en la Figura 11, *P. chlamydosporia* produce etanol a partir del día 4, los valores de producción obtenidos se encuentran entre el 0.5 y 2%, en cultivos con 1-3 mg/ml de quitosano. En el caso de *B. bassiana* la producción se sitúa entre el 0.25 y 0.75% a partir de las concentraciones de quitosano de 0.5 y 0.75 mg/ml. Sin embargo, *M. anisopliae* produce cantidades escasas (menos del 0.5%) en comparación con los otros dos hongos.

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de bioetanol a partir de una fuente de quitosano que comprende el uso del hongo *Metarhizium anisopliae*.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la fuente de quitosano es un producto que
5 comprende quitosano, quitina o derivados de los mismos.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la fuente de quitosano proviene de residuos marisqueros.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el hongo se encuentra en una concentración comprendida de 10^4 - 10^7 esporas/ml.
- 10 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la adición de nutrientes.
6. Uso de *Metarhizium anisopliae* para la producción de etanol a partir de quitosano.
7. Uso de *Metarhizium anisopliae* para la degradación de residuos marisqueros y obtención de biomasa fúngica y bioetanol.

15

FIG. 1

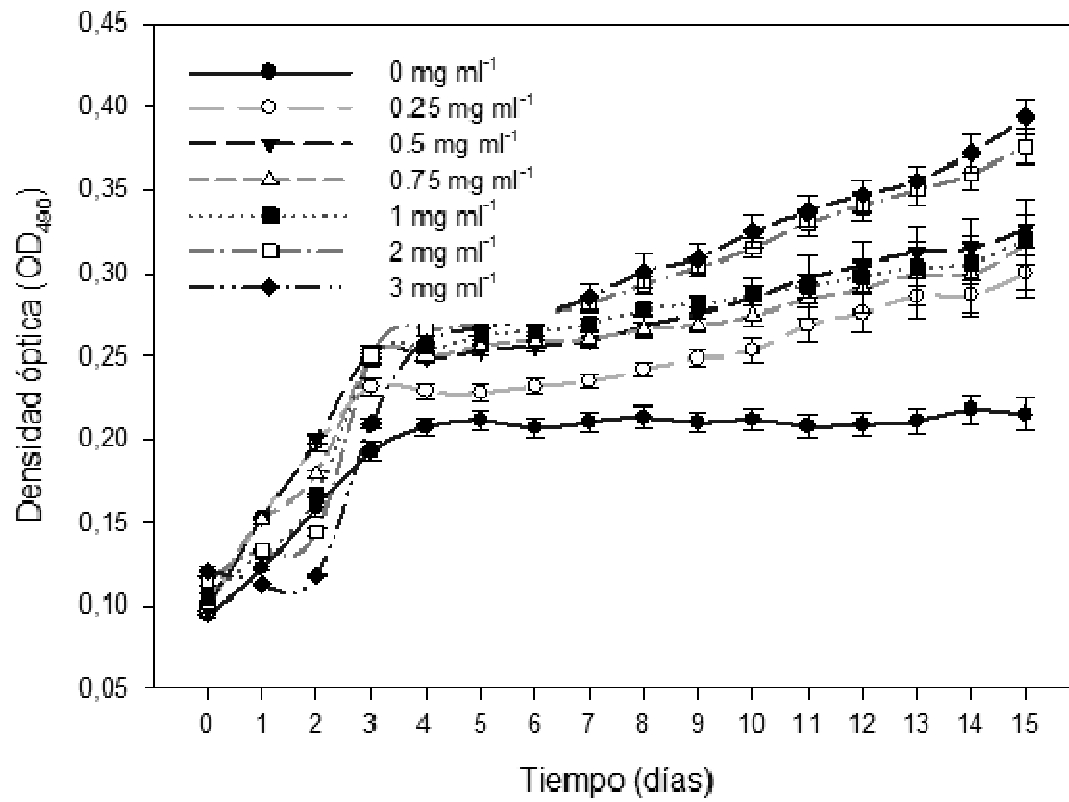


FIG. 2

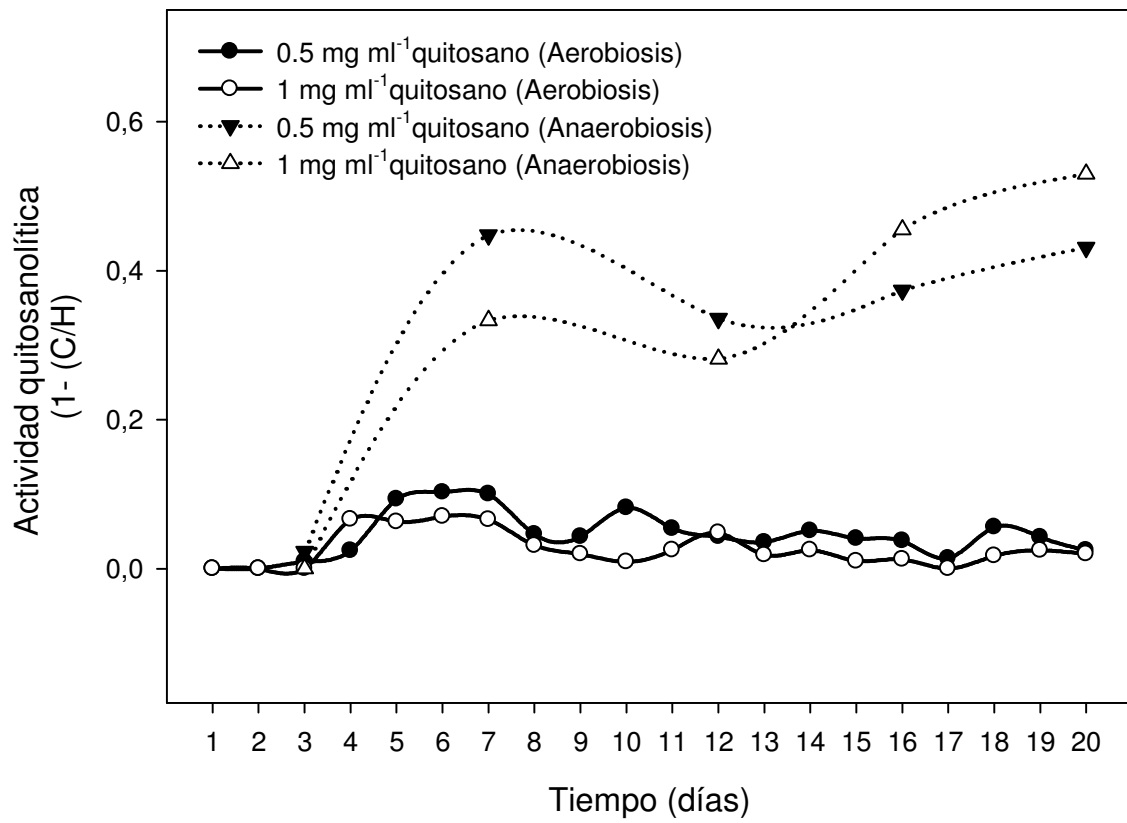


FIG. 3

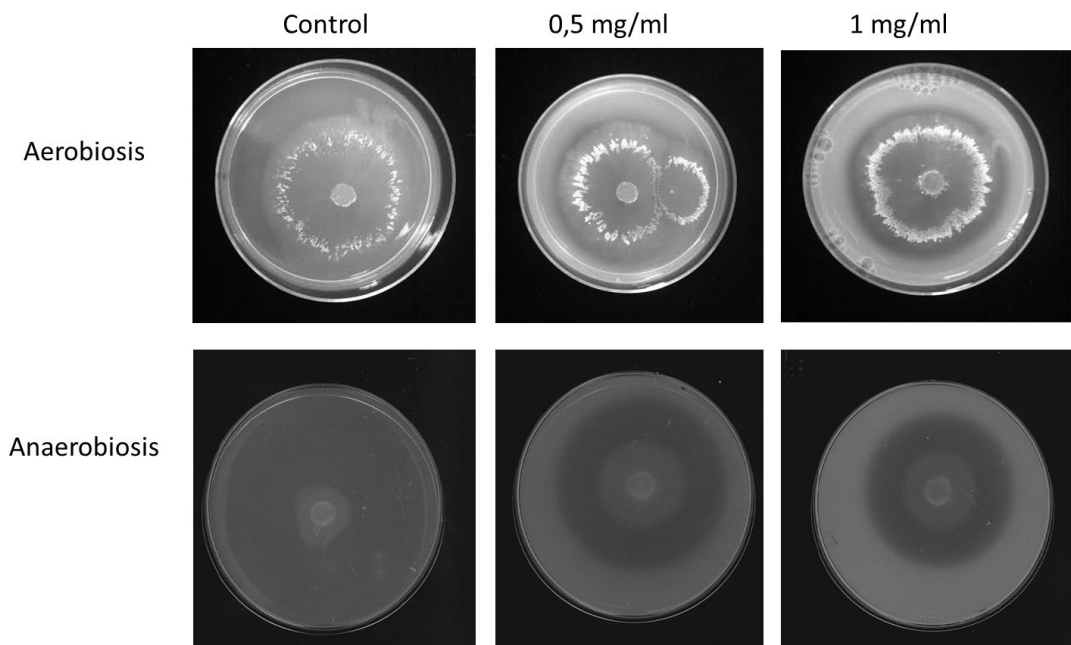


FIG. 4

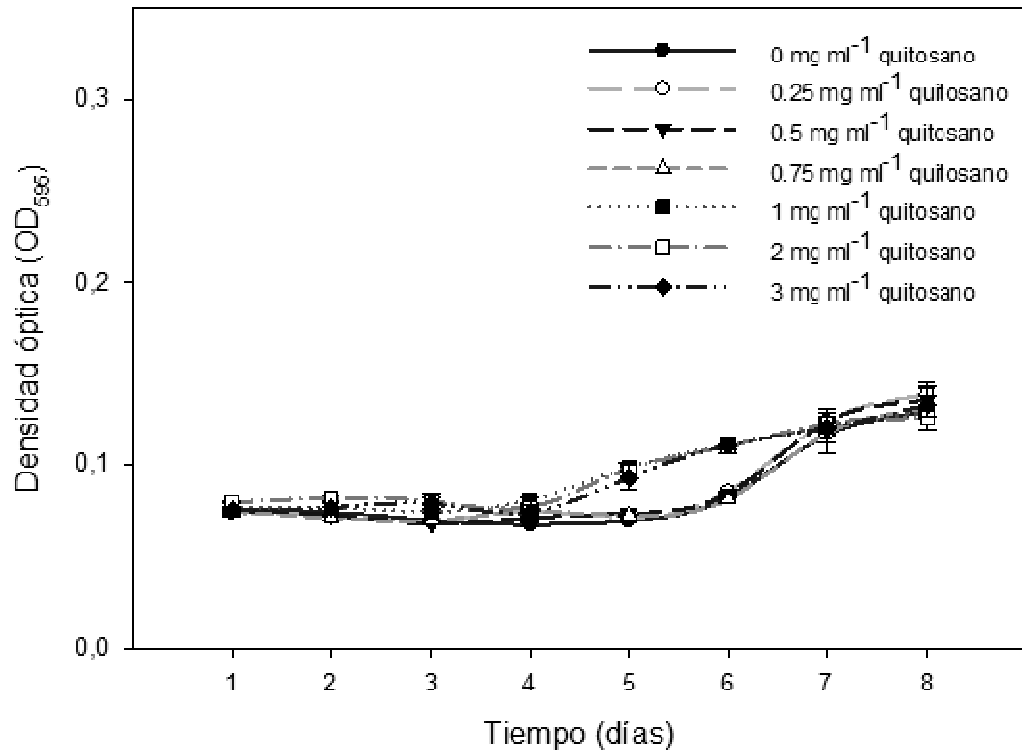


FIG. 5

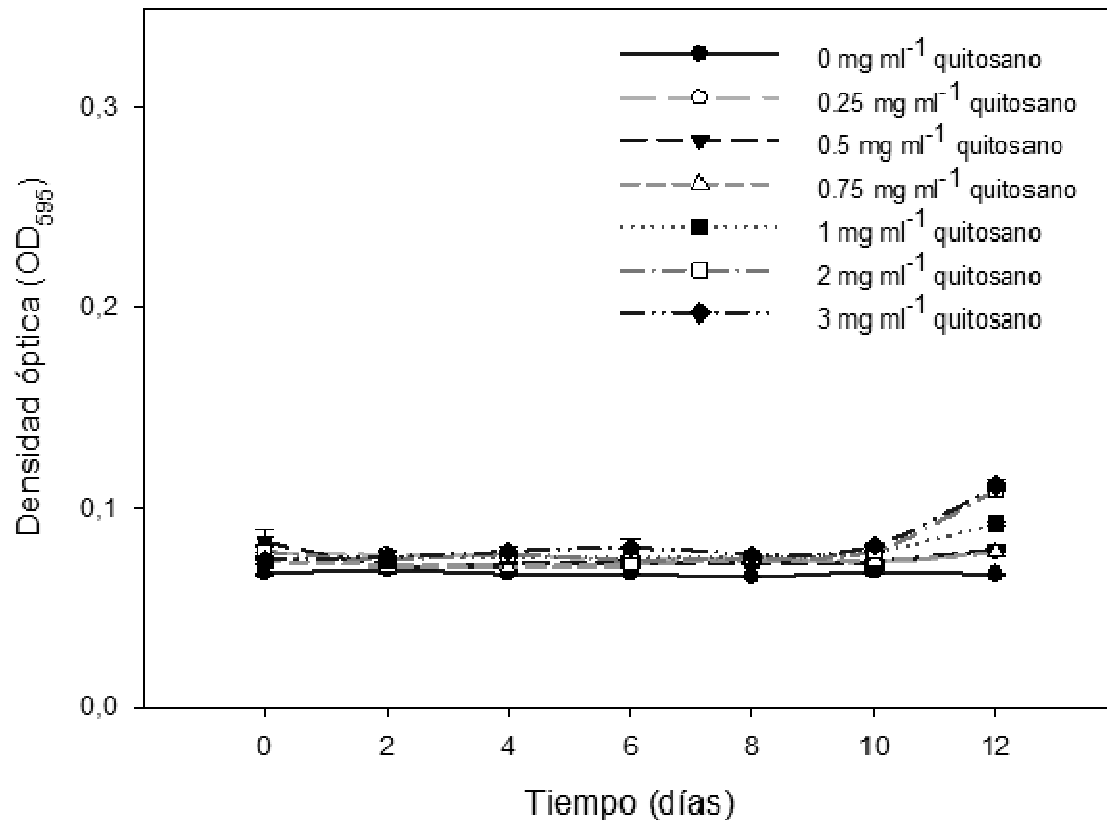


FIG. 6

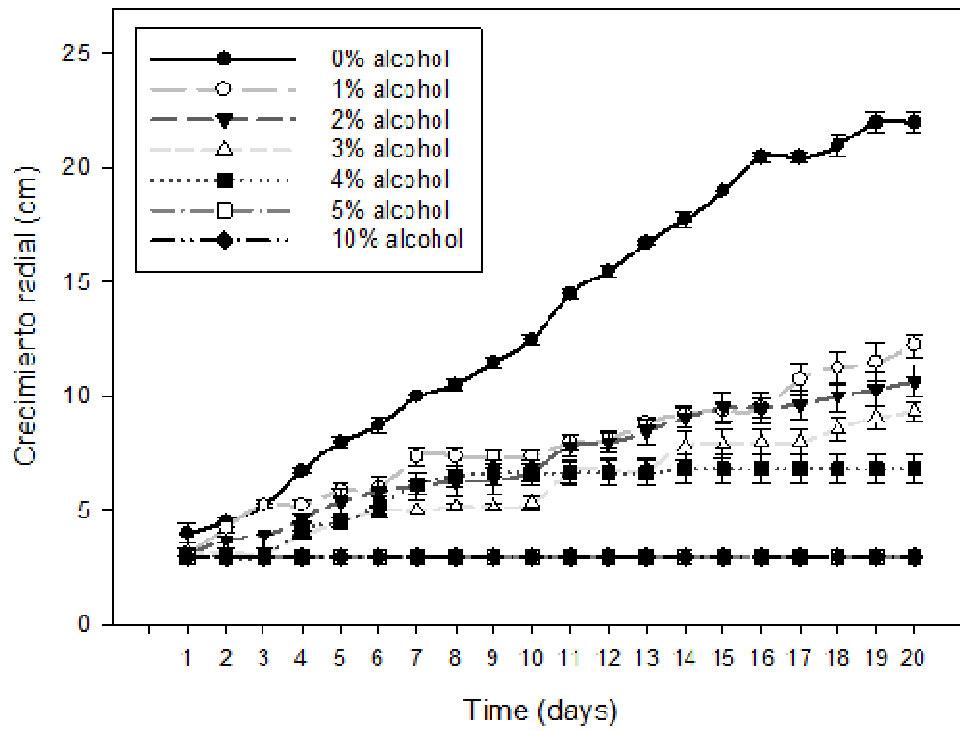
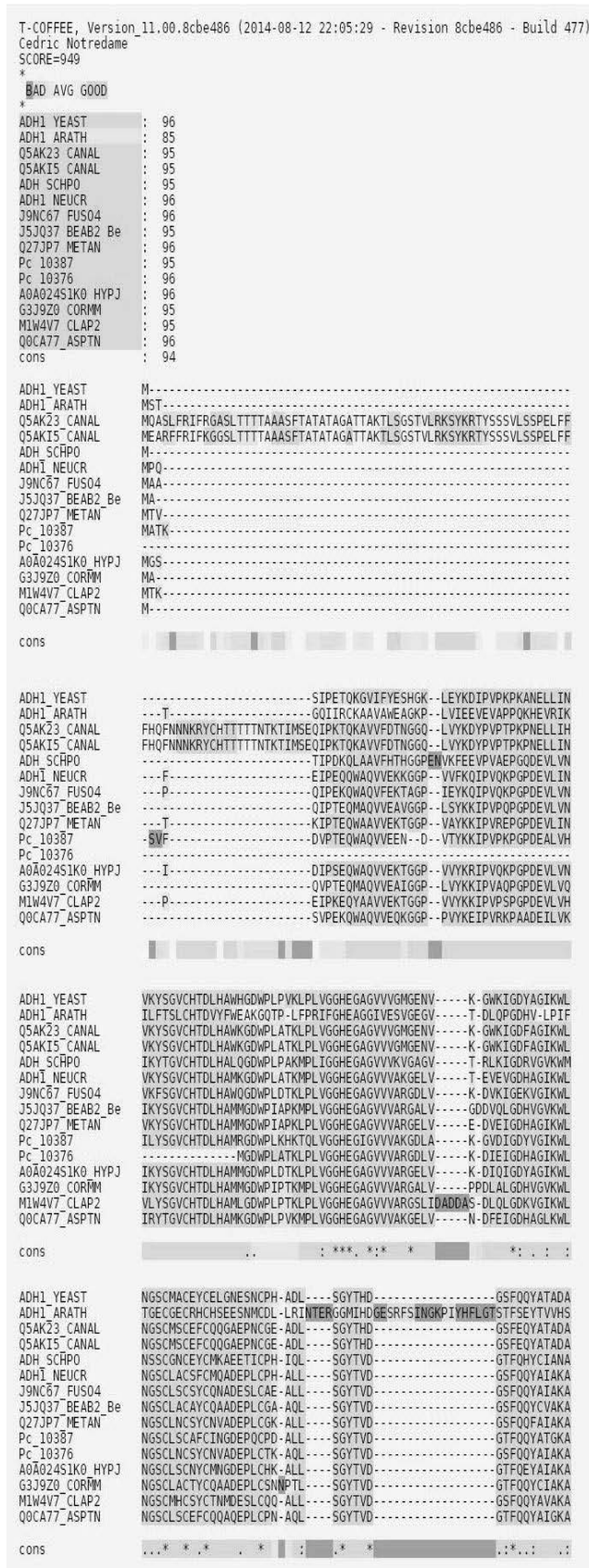


FIG 7



ADH1_YEAST VQAAHPIPGTDLAQVAPILCAGITVYK--ALKSANLMAGHWVAISGAAGGLGSLAVOYAKAMG
 ADH1_ARATH GQVAKINPDAPLDKVCIVSCG-LSTGLGATLNVAKPKKQSVVAFGLGA-VGLGAAEGARIAG
 Q5AK23_CANAL VQAAKIPAGTDLANVAPILCAGVTYK--ALKTADLAAGQWVAISGAGGGLGSLAVOYARAMG
 Q5AK15_CANAL VQAAKIPAGTDLANVAPILCAGVTYK--ALKTADLAAGQWVAISGAGGGLGSLAVOYARAMG
 ADH_SCHPO THATIIPESVPLEVAAPIMCAGITCYR--ALKESKVGPGEWICIPGAGGGLGHLAVOYAKAMA
 ADH1_NEUCR AHVAKIPKGCDELTTAPVLCAGITVYK--GLKESGVRPGQCVAIVGAGGGLGSMAIQYANAMG
 J9NC67_FUS04 IHVARIPKECDLESISPILCAGITVYK--GLKESGVKAGQSIIVGAGGGLGSLAVOYKAMG
 J5JQ37_BEAB2_Be AHVARIPKCDLAEIAPLLCAGITVYK--GLKESGARAGOSVVVAGAGGGLGSLACQYARAMG
 Q27J37_METAN AHVARIPKCDLEAISPILCAGITVYK--GLKESGAOPGQSVVAVGAGGGLGSLACQYAKAMG
 Pc_10387 MHLTQIPKCDL SAAAPILCAGLTVYK--GLKESGARPAQFVAIVGAGGGLGSLAIQYAKAMG
 Pc_10376 AHVARIPKCDLEAIAPILCAGITVYK--GLKESGAKAGESVAIVGAGGGLGSLACQYAKAMG
 A0A02451K0_HYPJ AHVARIPKCDLESVAPILCAGITVYK--GLKESLARPPGQTIIVGAGGGLGSLALQYAKAMG
 G3J920_CORMM AHVARIPKCDLEAVAPILCAGITVYK--GLKESGAKAGOSVVVAGAGGGLGSLACQYARAMG
 M1W4V7_CLAP2 AHVARIPADCDLEAVAPILCAGLTVYK--GLKESGARAGQTVAVVAGAGGGLGCFAIQYAKAMG
 Q0CA77_ASPTN ALASKIPKNVPLDAVAPILCAGLTVYK--GLKESGARPGQTVAVVAGAGGGLGSLALQYAKAMG

cons : * * . : * . : : * : . . : * . : * * : . . :

ADH1_YEAST -YRVLGIDGGEGKEELFRSITGGVEVDFIDFTKE-KDIVGAVLKATD-G-GAHGVINVSVEAAIE
 ADH1_ARATH ASRIIGVDFNSKRFDQAKFVTECVNPKDH-DKPIQQVIAEMTDG-GVDRSVECTGSVQAMI
 Q5AK23_CANAL -LRVVAIDGGDEKGEFVKSLGAEAYVDFTKD-KDIVEAVKKATD-G-GPHGAINVSVEKAID
 Q5AK15_CANAL -LRVVAIDGGDEKGEFVKSLGAEAYVDFTKD-KDIVEAVKKATD-G-GPHGAINVSVEKAID
 ADH_SCHPO -MRVVAIDTGDGKAEELVKSFGAEVFLDFKKE-ADMIEAVKAAATN-G-GAHGTLVLSSTPKSYE
 ADH1_NEUCR -LHAIAIDGGEEKGNKRELGAQAYVDFTTT-KDLVADVKAATPGLGPHAVILLAVTEKPFH
 J9NC67_FUS04 -IHAIAIDGGEEKGKLTKELGATAYVDFTTT-KNLVADVKAATSDGLGPHAAILLVATNEKPFQ
 J5JQ37_BEAB2_Be -LRVIGIDTGDDEKRALVQSYGAD-FVDFRSS-KDIVSEIRALTPDGLGAHAALLAVQEGPFQ
 Q27J37_METAN -LNLIAIDAGDEKRMCLKLGADVDFVDFMFS-TDLVAEVKAASADGLGPHAVILLAVTEKPFQ
 Pc_10387 -LRTIADVAGEAKGKFTSLGADAYVDFMFS-NDLVKDIIKAATDGLGPHAAILLVAAQEGPFH
 Pc_10376 -FKIIAIDAGAEKDMCMKLGADTFVDFMFS-KDLVSEVKAASNDGGPHAVILLAVTEKPFQ
 A0A02451K0_HYPJ -LRSIAIDAGDEKRDLCMLRGASAFVDFMFS-KDLVADVRAATVDGEGPHAAILLVAAQEGPFQ
 G3J920_CORMM -LRVIGVDTGADKQALVQSYGCD-FVDFMFS-KDLVADVKAATPGLGPHAAILLVAAQEGPFQ
 M1W4V7_CLAP2 -LHVVAIDGGAEKRLCLEL GASVYVDFMFS@GSLVEDVVKRASVDGLGPHAVILLVAAQEGPFQ
 Q0CA77_ASPTN -LRAVAIDGGEEKRQMCQSLGAEAYVDFFAAS-QNVVEDVKAATPGLGPHAVILLVAAQEGPFQ

cons . . : : * . : : * : . . : * * . : : .

ADH1_YEAST ASTRYVR-ANGTTVLVGMVAGAKCCSDVFNQVVKSSISIVGSGYVGNRADTRE---ALDFFAR--
 ADH1_ARATH QAFECVHIGWGVAVLVGVP SKDDAFKTHPMNPLNERTLKGTFFGNYKPKTDIPGVVEKYPNKE
 Q5AK23_CANAL QSVEYVR-PLGKVVVLVGLPAHAKVTAPVFDVAVKSIETIKGSGYVGNRQDIAE---AIDFFSR--
 Q5AK15_CANAL QSVEYVR-PLGKVVVLVGLPAHAKVTAPVFDVAVKSIETIKGSGYVGNRQDIAE---AIDFFSR--
 ADH_SCHPO QAAQFAR-PGSTMVTVSMPAGAKLGADIFWLTVKMLKICGSHVGNRIDISIE---ALEYVSR--
 ADH1_NEUCR QAVDYVR-SRGTIICIGLPAGAKFQAPVFDTVIRMITIKGSGYVGNRQDIAE---ALDFFAR--
 J9NC67_FUS04 QATQYIR-SRGTVVCIGLPAQAQFSAFVFDTVVIRMITIKGSGYVGNRQDIAE---AIDFFRR--
 J5JQ37_BEAB2_Be QATQYVR-SRGVVVICIGLPADAHFKAPVFDTVLRMIQIRGSGYVGNRQDIAE---AIEFYRK--
 Q27J37_METAN QATQYVR-SRGVVVICIGLPANAKL SAFPVFDTVIRMITIKGSGYVGNRQDIAE---AIEFYRR--
 Pc_10387 QATEYVR-PRGTVVCVGMPEKAQIKASVFDVVRMLSIKSGYVGNRADANE---AVEIFRA--
 Pc_10376 QATQYVR-SRGVVVICIGLPADAKL SAFPVFDTVIRMITIKGSGYVGNRQDIAE---AIEFYRR--
 A0A02451K0_HYPJ QATEYLR-SKGVLCIGLPAGARL SAFPVFDTVIRMITIKGSGYVGNRQDIAE---ALDFFRR--
 G3J920_CORMM QATQYVR-SRGVVVICIGLPADAHFKAPVFDTVLRMIQIRGSGYVGNRQDIAE---AIEFFRL--
 M1W4V7_CLAP2 QATQYVR-AHGTVVCIGLPANANFSAFVFDTVVIRMITIKGSGYVGNRQDIAE---ALDFFAR--
 Q0CA77_ASPTN QAADYVR-SRGTIIVAIIGLPANAFKAPVFNTVVIRMITIKGSGYVGNRQDIAE---AIDFFAR--

cons : : . : : : * : : : * : * . : : : :

ADH1_YEAST -GLVKSPIKVVGLSTLPEIYEKMEKQIVGRYVVDTSK
 ADH1_ARATH ELEKFIHTVFPSEINKAFDYMLKGESI-RCIITMGA
 Q5AK23_CANAL -GLIKCPKIKIVGLSDLPEVFKLMEEGKILSRVLDTS-S
 Q5AK15_CANAL -GLIKCPKIKIVGLSDLPEVFKLMEEGKILGRVLDTSK
 ADH_SCHPO -GLVKPYKVPFSTLPDYYRLMHNKIAGRIVLDSLK
 ADH1_NEUCR -GLIKVPKIKTVGLSKLQEVYDLMEEGKIVGRYVVDTSK
 J9NC67_FUS04 -GLIKVPKIKTVGLSELNEVYKLMKAGQIVGRYVVDTSR
 J5JQ37_BEAB2_Be -GLVKPYKVVGLSELPAYYDLMKAGQITGRVLDTSR
 Q27J37_METAN -GLINAPFKTVGLSQLQDYYELMKEGKIAGRYVVDTSK
 Pc_10387 -GLVKVPKTVGLSKLSEVDFAMASGDIIGRYVLDTSK
 Pc_10376 -GLINAPFKTVGLSQLQDVFVKLMKEGKIAGRYVVDTSK
 A0A02451K0_HYPJ -GLITVPKTIIGLSQLQDIYTLNHEAKIAGRYVVDPTR
 G3J920_CORMM -GLIKVPKIKTVGLSELPTVYDLNRAGKITGRVLDMSR
 M1W4V7_CLAP2 -GLIKVPKIKTVGLSELQDYYKLMSEGKIAGRYVVDTSK
 Q0CA77_ASPTN -GLIKAPFKVAPLKDLPKIFELMEQKTIAGRYVVDVQP

cons * . : : : * . * : :

FIG. 8

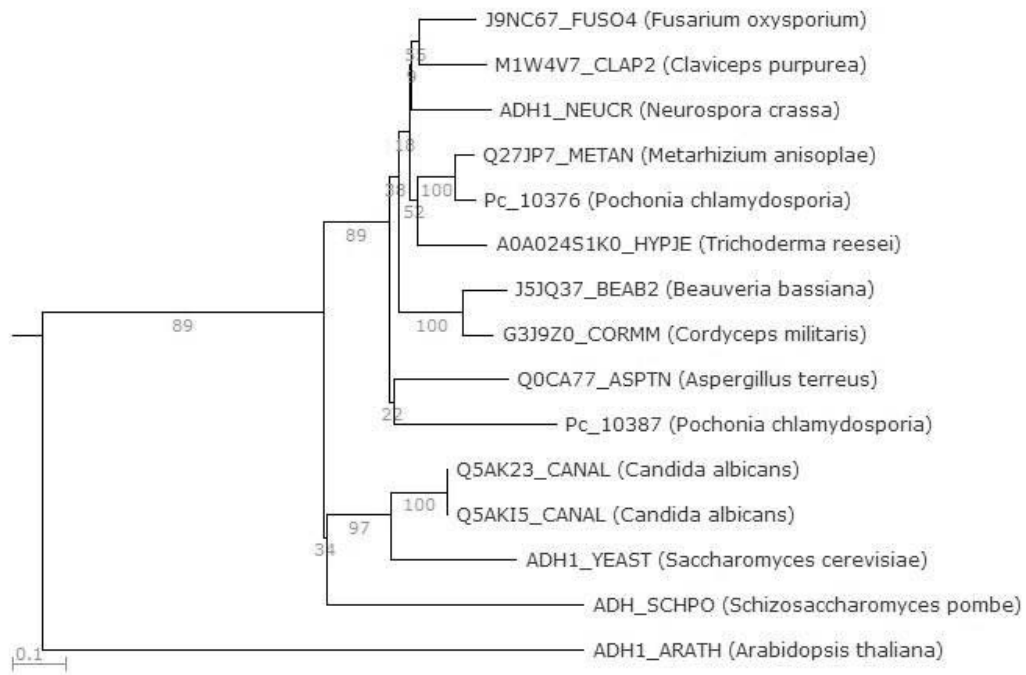


FIG. 9

```

T-COFFEE, Version 11.00.8cbe486 (2014-08-12 22:05:29 - Revision 8cbe486 - Build 477)
Cedric Notredame
SCORE=960
*
BAD AVG 6000
*
PDC1 YEAST S.ce : 96
PDC4 SCHPO S. : 96
Pc 2854 Pochoni : 97
PDC1 CANAL Cand : 96
Q754N8 NEUCR N. : 97
J9M2O2 FUSO4 Fu : 97
J4UB2 BEAB2 Be : 97
E9EW0 METAR Me : 97
PDC2 ARATH A.th : 92
G3J3U9 CORFM : 96
MIW5H2 CLAP2 : 97
G6RHV1 HYPJQ : 97
PDC_ASPTN : 96
cons : 96

PDC1 YEAST S.ce MS ----E-----ITLGYLFEELKQ
PDC4 SCHPO S. MS----S-----EK-VLVGYLFLRLLQ
Pc 2854 Pochoni MT----DLRVQS-----LRSP-IDVSEYLFRRLYE
PDC1 CANAL Cand MS----E-----ITLGRFFERLHO
Q754N8 NEUCR N. MS----DIRTQS-----LQKP-VTVAEYLFRRLHO
J9M2O2 FUSO4 Fu MS----N--SN-----LQKP-IDVAEYLFRRLYE
J4UB2 BEAB2 Be MT----DIRVMN-----LKAP-VDVAEYLFRRLYE
E9EW0 METAR Me MA----DIRVQS-----LRKP-IDVSEYLFRRLYE
PDC2 ARATH A.th MD----T-KIGSIDACNPTNHQIGGPPNGGVSTQNTSPLHSTTVSP@ATLGRYLARRLVE
G3J3U9 CORFM ME@RT@DIRVRN-----LKKP-VDVAEYLFRRLYE
MIW5H2 CLAP2 M-----DIRVKS-----LERP-MDVAEYLFRRLHE
G6RHV1 HYPJQ MT----NIREQS-----LEOP-VDVAEYLFRRLHE
PDC_ASPTN MA----TDIATKE-----LHKP-VDVAEYLFRRLYE

cons *  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

PDC1 YEAST S.ce VNVVTVFLPGDGFNLSDDKI-YEVE---GMRWAGNANELNAAYAADGYARIK--GMSCIIIT
PDC4 SCHPO S. LGIKSLGVLPGDFNLALLDLI-EK-VGD@ETFRWGNENELNAGAYADAYARKV--GISAIVTT
Pc 2854 Pochoni VGVRSVHGVPGDYNLVALDCL-PK-C---GLRWVGSVNEELNAGAYADGYARKV--QIGALITT
PDC1 CANAL Cand LKVDTVFLPGDGFNLALLDKI-YEVE---GMRWAGNANELNAGAYADGYARVNN@GLSALVST
Q754N8 NEUCR N. IGIRSVHGLPGDGFNLVALDYV-PK-A---GLKWVGSVNEELNAGAYADGYARAK--GISALVTT
J9M2O2 FUSO4 Fu VGVRSVHGVPGDYNLVALDYV-PQ-C---NLKWVGSVNEELNAGAYADGYARIT--KMAALITT
J4UB2 BEAB2 Be IGIRSVHGVPGDYNLVALDYV-PK-A---NLKWVGSVNEELNAGAYADGYARIN--TVGALITT
E9EW0 METAR Me VGVRSVHGVPGDYNLVALDYV-PK-S---GLKWVGSVNEELNAGAYADGYARKV--QIGALLTT
PDC2 ARATH A.th IGVTVFSVPGDFNLLDLH@AE-P---NLKIGCCNELNAGAYADGYARSR--GVGCVYT
G3J3U9 CORFM VGVRSVHGVPGDYNLVALDYV-PK-A---GLKWVGSVNEELNAGAYADGYARKV--TIGALVTT
MIW5H2 CLAP2 VGVRSVHGVPGDYNLVALDYV-PQ-V---GLKWVGSVNEELNAGAYADGYARKV--GIGALITT
G6RHV1 HYPJQ IGIRSVHGLPGDYNLIALDYV-PT-C---GLKWVGSVNEELNAGAYADGYARKV--QMGALITT
PDC_ASPTN VGVRAVHGVPGDYNLALDYV-PK-C---GLWVGWVNEELNAGAYADGYARIN--GISALVTT

cons :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

PDC1 YEAST S.ce FGVGELSAINGIAGSYAEHVGLVHVVGVPSISAQAKQLLHHTLGNQDFTVFRHMSANVISETT
PDC4 SCHPO S. FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGVPNTAQATRPLHHTLGNQDQVFFQFMSSLSADV
Pc 2854 Pochoni FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGVPSTLSORDQMLHHTLGNQDFNVFAMNSAQISQV
PDC1 CANAL Cand FGVGELSAINGIAGSYAEHVGLVHVVGVPSISAQAKQLLHHTLGNQDFTVFRHMSANVISETT
Q754N8 NEUCR N. FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGCPSTISORNGMLHHTLGNQDFNVFAMNSAISQV
J9M2O2 FUSO4 Fu FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGCPSTISORDQMLHHTLGNQDFNVFAMNSAQISQV
J4UB2 BEAB2 Be FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGCPSTISORDQMLHHTLGNQDFNVFAMNSAISQV
E9EW0 METAR Me FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGCPSTISORDQMLHHTLGNQDFNVFAMNSAISQV
PDC2 ARATH A.th FTVGGLSVMNATAGAYSENLPLICTVGGPNSNDYTNRLHHTLGLPDTQELRCFQAVTFCV
G3J3U9 CORFM FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGCPSTISORNGMLHHTLGNQDFNVFAMNSAISQV
MIW5H2 CLAP2 FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGCPSTISORNGMLHHTLGNQDFNVFAMNSAISQV
G6RHV1 HYPJQ FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGCPSTISORNGMLHHTLGNQDFNVFAMNSAISQV
PDC_ASPTN FGVGELSAINGIAGSYAEHVPVHIVGCPSTISORNGMLHHTLGNQDFNVFAMNSAISQV

cons * * * * :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

PDC1 YEAST S.ce AMITDIATAPAEIDRCIRTYVTRPVYVGLPANLVOLNVP-AKLOTPIDMSLKPNDASEK
PDC4 SCHPO S. AFLDSGASGRIDLNLLETCTVRTSRPVYLAVP@DAGIFYTD-ASPLKTLVFPV@ENKWEIEH
Pc 2854 Pochoni AKLNSP@EADQIDHALRECVHSRPPVITLPTDMQ@KVE-GHRLCKPIDLSEP@NDPEKED
PDC1 CANAL Cand AFIADINS@PAEIDRCIRDAVYVQRPVIVLPSNLVDMKV@-KSLDKIDL@LH@NDPEKED
Q754N8 NEUCR N. AKL@NPSEIAYQID@ALRECVHSRPPVITLPTDMQ@KVE-GARL@DIDLSEP@NDPEKED
J9M2O2 FUSO4 Fu AKLNP@DIAVLIDHALRECVHSRPPVITLPTDMQ@KVE-GARL@DIDLSEP@NDPEKED
J4UB2 BEAB2 Be AKLNP@DIAVLIDHALRECVHSRPPVITLPTDMQ@KVE-GARL@DIDLSEP@NDPEKED
E9EW0 METAR Me AKLNSP@EADQIDHALRECVHSRPPVITLPTDMQ@KVE-GARL@DIDLSEP@NDPEKED
PDC2 ARATH A.th AVTNLEEAH@LIDT@I@STALKESXPVYISICNLP@PLP@SRHPV@PMLPKVSNQIGLD
G3J3U9 CORFM AKLNP@DIAVLIDHALRECVHSRPPVITLPTDMQ@KVE-GORL@DIDLSEP@NDPEKED
MIW5H2 CLAP2 AKLNP@EIA@DIDHALRECVHSRPPVITLPTDMQ@KVE-GARLS@DIDLSEP@NDPEKED
G6RHV1 HYPJQ AKLNP@EIA@DIDHALRECVHSRPPVITLPTDMQ@KVE-GARL@DIDLSEP@NDPEKED
PDC_ASPTN GR@L@N@E@V@L@I@D@N@A@R@C@H@L@R@S@R@P@V@I@G@L@P@D@I@V@K@I@E-GORL@D@L@D@L@S@L@P@ND@P@E@K@E

cons :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

PDC1 YEAST S.ce EVI@DIT@L@L@V@K@A@K@N@P@V@L@D@A@C@C@S@R@H@V@K@A@E@K@L@I@D@L@T@O@P@F@V@P@M@G@K@S@I@E@O@H@P@R@Y@G@G
PDC4 SCHPO S. EVVSEI@L@E@K@S@K@N@P@S@I@L@V@D@C@Y@S@R@H@I@Q@E@T@O@D@F@I@A@H@P@T@Y@V@P@M@G@K@A@I@N@E@S@P@Y@F@D@G
Pc 2854 Pochoni YVVDVIM@Y@L@N@A@K@P@L@L@I@D@A@C@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@S@L@P@I@F@V@P@M@G@K@A@I@N@E@O@H@N@P@F@D@G
PDC1 CANAL Cand EVIET@V@E@K@L@S@E@A@N@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
Q754N8 NEUCR N. YVVDVIL@R@Y@L@H@G@A@K@N@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
J9M2O2 FUSO4 Fu FVVD@E@L@K@A@M@Y@A@O@R@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
J4UB2 BEAB2 Be YVVDVIL@R@Y@L@S@A@K@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
E9EW0 METAR Me YVVDVIM@Y@L@N@A@K@N@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
PDC2 ARATH A.th AAVEA@A@E@F@L@N@A@K@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
G3J3U9 CORFM YVVDVIL@R@L@K@S@K@P@V@L@I@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
MIW5H2 CLAP2 YVVDVIL@K@Y@L@N@A@K@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
G6RHV1 HYPJQ YVVDVIL@K@Y@L@R@A@K@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G
PDC_ASPTN YVVDVIL@K@Y@L@H@A@K@N@P@V@L@V@D@C@A@I@R@H@R@V@L@E@V@H@L@E@K@I@E@T@O@P@V@F@T@P@M@G@K@A@I@N@E@D@H@N@P@F@G@G

cons :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

```

PDC1_YEAST_S.ce VYVGTLSKP-EVKEAVESADLILSVGALLSDNFNTGFSYSYKTKNIVEFHSDHMKIRNA-TFP
PDC4_SCHPO_S. VYIGSLTEP-SIKERAESTDLLLLIGGLRSDNFMTGTYATPASQTEIFHSDYTKRSG-VYE
Pc_2854_Pochoni VYAGNGSHHPEVKDMVESSDLIIIGALKSDNFMTAGFSYRSTQNLSDHSDHCVRYS-TYP
PDC1_CAÑAL_Cand VYVGTLSKP-EVKEAVESADLILSVGALLSDNFNTGFSYKTRNIVEFHSDYTKRQA-TFP
Q754N8_NEUCR_N. VYAGTGLSP-EVAKRVEGSDLLSIIIGALKSDNFMTAGFSYHTSOLNTIDLHSDHCIVRYS-EYP
J9M202_FUS04_Fu VFAGDGHSHARAQSIIVEGSDLLLIIIGALKSDNFMTGFSYRSTQNSVDFHSTHCKVRY-SYP
J4UFB2_BEAB2_Be VYAGEGSPYVWKFVSSDILLISIGTQSDNFMTAGFSYRSTQNSVDFHSDHCIIHYS-TYP
E9EW0_METAR_Me VYAGDGHHPPEVKDIESSDLVSIIGALKSDNFMTAGFSYRSTQNLSDHSDHCIVRYS-TYP
PDC2_ARATH_A.th TYWGAVSTA-FCAEIVESADAYLFA GPIFNDSYSGVSLLLKKEKAIIVQDRVTIIGNGAFG
G3J3D9_CORMM VYAGEGSRPYVWKAIVESDILLISIGTQSDNFMTAGFSYRSTQNLVIDLHSDHCIIHYS-TYP
M1W5H2_CLAP2 VYAGAGSHHPPEVKDIESSDLIIIGALKSDNFMTGFSYRSTQNLSDHSDHCIVRYS-TYP
G0RHV1_HYPJQ VYAGAGSHPPQVQKDISSDILLIIIGALKSDNFMTAGFSYRSTQNLIDLHSDHCIVRYS-TYP
PDC_ASPTN VYAGTGSNP-GVREQVSSDILLIIIGALKSDNFMTGFSYRSTQNLIDLHSDYTVRYS-EYP

cons : : * : : . : . : . : * : * : : : : : . : : :

PDC1_YEAST_S.ce GVQMKFVLQKLLTTIADAAK-GYKPYAVP--ARTPANAIV--PASTPLKOEWMNQLGNFLQE
PDC4_SCHPO_S. GISMHLLPKLTAADIKKSV-QAKARPVHEEPKAVAAEG--YAEGTITHKWFMTFASFLFE
Pc_2854_Pochoni GVRMRGVLQKIASRIDPKKL-SVRDTPRV--RNEVKEH--DTSTTIQSWFMRPRLGEFLAD
PDC1_CAÑAL_Cand GVQMKALQKLLTTVKKSIINNYTPVVPV--ETKLINTPA--APSTPLTQEWLWTKVWSWFRF
Q754N8_NEUCR_N. GVAMRGVLRKVRTERIDMSKL-SITPSPPV--ENAVAEH--DSSQAITQAWFMRPVEYFQE
J9M202_FUS04_Fu GVAMRGVLRKVIDRVPKSM-PAPSPEV--RNEVEKN--DSSQAITQAWFMRPVEYFQE
J4UFB2_BEAB2_Be GARMKGVLRLRLNDAMPKSL-SVTQALAF--KNEVOEND--DGTPTIITQAWFMRPVEFFAK
E9EW0_METAR_Me GVRMKGVLQKVVKRIKPKQL-NIRASPAV--RNEAREH--DGSATITQAWFMRPRLGEFLD
PDC2_ARATH_A.th CVLMDLDELAKRIKHNT-SYENYHRI-WYPEGKPLRD--NPNESLRVNVLFQHOINMLSS
G3J3D9_CORMM GARMKGVLRLRIDLALDPSQL-FITQVPAV--KNOVAEND--DGTPTIITQAWFMRPVEFFAK
M1W5H2_CLAP2 GTRMKGVLQKLIKIQPAQL-NIRPTPTV--PRGAOPH--DGSPTITQAWFMRPVEFFLRE
G0RHV1_HYPJQ GVAMRGVLRQVKKIKNOSEL-SVOPSPTV--ENEVTKIL--DSSQAITQAWFMRPVEFLRK
PDC_ASPTN DINMKGVLRLKVVQRMGHV--NALPVQRL--SNALPDNERGSSSQEITAWLWPIVQWLKE

cons * : * : : | : : : : : | : : : : : | : : : : :

PDC1_YEAST_S.ce GDVVIETGTSAFGINOTTFPNNYGSIVLWGSIGFTTGATLGAFAAEEID-PKKRVILFI
PDC4_SCHPO_S. SDVVTTEGTSNFGILDCIFPKGCONLSQVLWGSIGSWGAMFGATLGKDSBPHRRSILIV
Pc_2854_Pochoni QDIVITETGTANFNGIDWTKFPVGSALSQVLWGSIGSWGACQGAALAAKDMG-VERRTILFV
PDC1_CAÑAL_Cand GDIIITETGTSAFGIVQSRFPKNSIGSIVLWGSIGYGTGATCGAAMAAQELD-PKRRVILFV
Q754N8_NEUCR_N. GDVVVTEGTANFNGIWEISRFKDMGVTQVLWGSIGSWGAAQGAALAVKLE-QDRRTILFV
J9M202_FUS04_Fu NDIVVTEGTANFNGIWDTPFRNVLTALSQVLWGSIGSWGACQGAALAAKDMG-KEGRTILFV
J4UFB2_BEAB2_Be DDIVVTEGTANFNGIWSKFPSSVGTALSQVLWGSIGSWGAAQGAALAAKDMG-SKRRRTILFV
E9EW0_METAR_Me NDIVVTEGTANFNGIWDTPFPSVGTALSQVLWGSIGSWGACQGAALAAKDMG-EKRRRTILFV
PDC2_ARATH_A.th ESAVLAETGDSWFNCKLKLPEGCGYEFQMGYGSIGSWGATLGYAQAM----PNRRVIACI
G3J3D9_CORMM DDIVVTEGTANSFGIWSKFPAGVTALSQVLWGSIGSWGAAQGAALAAKDMG-SKRRRTILFV
M1W5H2_CLAP2 EDIVVTEGTANFNGIWDTPFRPVGTALQVLWGSIGSWGACQGAALAAKDMG-RDRRTILFV
G0RHV1_HYPJQ NDIVVTEGTANFNGIWDTPFGVTALSQVLWGSIGSWGACQGAALAAKDMG-SDRRTILFV
PDC_ASPTN RDIVVTEGTANFNGIWDTRFPANVTALISQVLWGSIGSWGACQGAALAAKDMG--NRRRTVLFV

cons . : : * * : * . : * : * : * * * * : : | : * : :

PDC1_YEAST_S.ce GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
PDC4_SCHPO_S. GDGSLHLTVQESATIRNGL-PIIFVINNKGYTIERLIHGLHAYVNDINTEWYQNLKLG-
Pc_2854_Pochoni GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
PDC1_CAÑAL_Cand GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
Q754N8_NEUCR_N. GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
J9M202_FUS04_Fu GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
J4UFB2_BEAB2_Be GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
E9EW0_METAR_Me GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
PDC2_ARATH_A.th GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
G3J3D9_CORMM GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
M1W5H2_CLAP2 GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
G0RHV1_HYPJQ GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-
PDC_ASPTN GDGSLQLTVOEISTMIRWGLK-PYLFLVNNQGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GWDHLSLLPTF-

cons * * * * : * * * * : : * * * * * * * * : * : :

PDC1_YEAST_S.ce GAKD--YETHRVATTGEWOKLTQDKSFNDNSKIRMIEMLPVFDAPONLVEQAKLTAATNAQ
PDC4_SCHPO_S. GAKN--SRSYNHSEKELLDLFDKDEEFGKADVTQLVEVHMPVLDAPRVLIEQAKLTAASLNKQ-
Pc_2854_Pochoni G6SG-KARKVAVRTKDELNLDLVDPTFKAAEKMOFVEVHMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ
PDC1_CAÑAL_Cand NAKD--YETKRISTVGELENLDFADKAFVDPKIRMVHMLPTMDAPANLVAQAKSEKTNAG
Q754N8_NEUCR_N. GAKEQOSQFVIKTKDELNLDLVDPTFKAAEKMOFVEVHMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ
J9M202_FUS04_Fu GGEK-TCKTFOIKTKTELNELLTKNEFNAECLQFVELVMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ
J4UFB2_BEAB2_Be G6SN-TAAKHVVKTSELEKLLDSTFNSADQLQFVEVMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ
E9EW0_METAR_Me G6GQ-KAQKFAVKTSELEKLLDSTFNSADQLQFVEVMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ
PDC2_ARATH_A.th NGEQ-KCNTAKVRCEELVKAINTAENEEKSFCFIEVIVHKODTKSELLEWGSRVSAANSRP
G3J3D9_CORMM G6SK-TCAKHVKTSELEKLLDSTFNSADQLQFVEVMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ
M1W5H2_CLAP2 GGTE-LAKKYSVETKSELEKLLDSTFNSADQLQFVEVMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ
G0RHV1_HYPJQ G6SK-TCKKFAVKTSELEKLLDSTFNSADQLQFVEVMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ
PDC_ASPTN GAKD-KYKGYRVKTRDELTKLFANDEFNSVPLQQLVELVHMPKDDAPRALVMTAEASARTNAQ--

cons . : . : : : * : * : . : *

PDC1_YEAST_S.ce ----
PDC4_SCHPO_S. ----
Pc_2854_Pochoni ---Q
PDC1_CAÑAL_Cand ----
Q754N8_NEUCR_N. EDEQ
J9M202_FUS04_Fu ---H
J4UFB2_BEAB2_Be ---N
E9EW0_METAR_Me ---E
PDC2_ARATH_A.th PNPQ
G3J3D9_CORMM ---S
M1W5H2_CLAP2 ---E
G0RHV1_HYPJQ ---E
PDC_ASPTN ----

cons █

FIG. 10

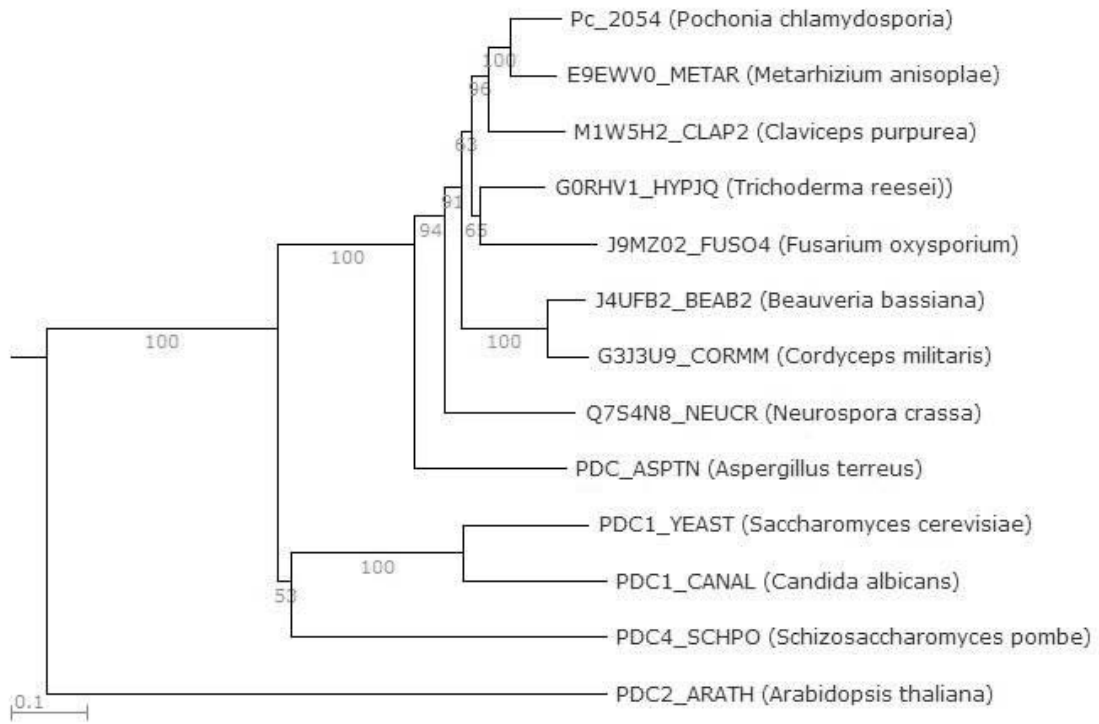
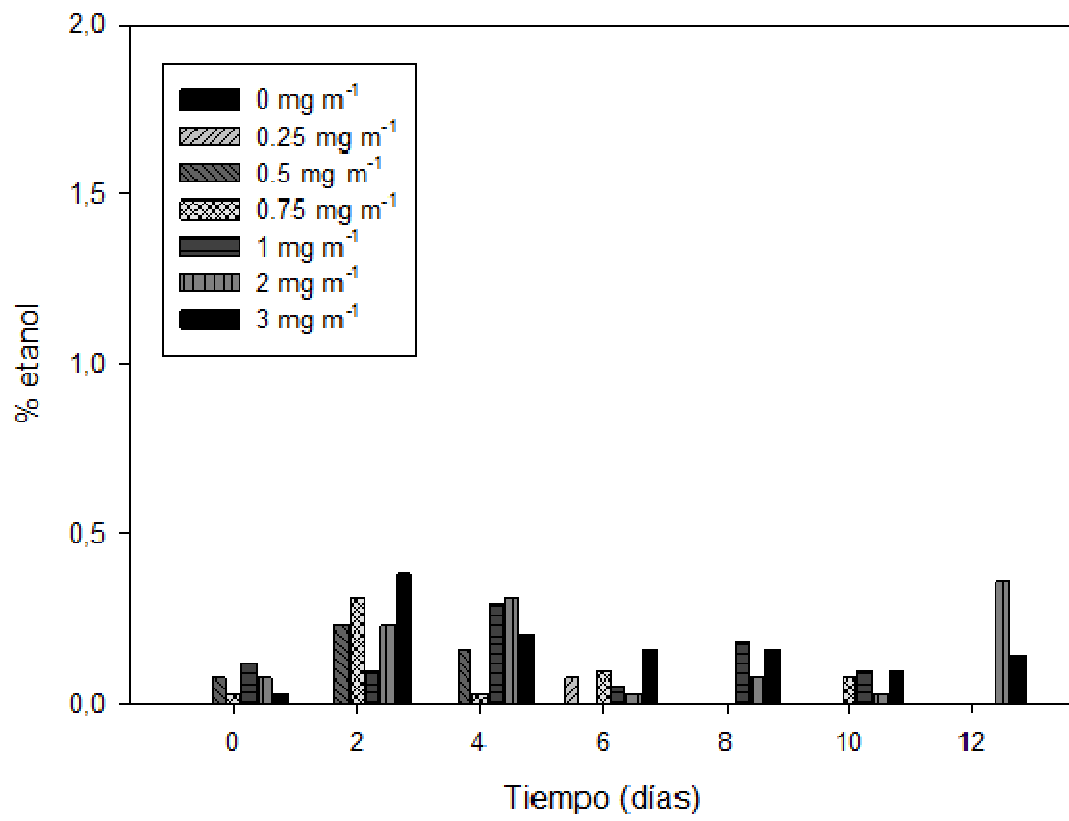


FIG. 11





- ②① N.º solicitud: 201530894
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.04.2015
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P7/08** (2006.01)
C12R1/645 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SCHRANK AUGUSTO et al. " <i>Metarhizium anisopliae</i> enzymes and toxins." Toxicon DIC 15 2010 (12.2010) VOL: 56 No: 7, Sp. Iss. SI Págs: 1267-1274 ISSN 0041-0101 Doi: doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.008; todo el documento.	1-7
A	SANCHEZ O J et al. "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks" BIORESOURCE TECHNOLOGY, 20080901 ELSEVIER BV, GB 01.09.2008 VOL: 99 No: 13 Págs: 5270-5295 ISSN 0960-8524 Doi: doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013; Jegatheesan Jega V; Chiemchaisri Chart; Shu Li; Guo Wenshan; todo el documento.	1-7
A	US 2011068057 A1 (HALEY III JOHN W et al.) 24.03.2011, todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.06.2016

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, XPESP, EMBASE/ELSEVIER

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.06.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SCHRANK AUGUSTO et al. " <i>Metarhizium anisopliae</i> enzymes and toxins." <i>Toxicon</i> DIC 15 2010 (12.2010) VOL: 56 No: 7, Sp. Iss. SI Págs: 1267-1274 ISSN 0041-0101 Doi: doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.008.	30.11.2010
D02	SANCHEZ O J et al. "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks" <i>BIORESOURCING TECHNOLOGY</i> , 20080901 ELSEVIER BV, GB 01/09/2008 VOL: 99 No: 13 Pags: 5270 - 5295 ISSN 0960-8524 Doi: doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013 Jegatheesan Jega V; Chiemchaisri Chart; Shu Li; Guo Wenshan.	01.09.2008
D03	US 2011068057 A1 (HALEY III JOHN W et al.)	24.03.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-7, es un procedimiento para la producción de bioetanol a partir de una fuente de quitosano mediante el uso del hongo *Metarhizium anisopliae* (reiv. 1-5). Es también objeto de la invención el uso de dicho hongo para la producción de etanol a partir de quitosano (reiv. 6) y para la degradación de residuos marisqueros y para la obtención de biomasa fúngica y bioetanol (reiv. 7).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga la capacidad que tiene el hongo nematófago *Metarhizium anisopliae* de degradar quitina. Este hongo es capaz de degradar quitina durante el proceso de infección de otros organismos. Mediante las enzimas quitinasas solubiliza la quitina del hospedador y la utiliza como única fuente de nutrientes.

El documento D02 divulga métodos para la producción de etanol a partir de diferentes materias primas como caña de azúcar, almidón y biomasa lignocelulósica, entre otros. Los microorganismos descritos en el documento que llevan a cabo las fermentaciones para la obtención de etanol son *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Escherichia coli* y *Zymomonas mobilis* entre otros.

El documento D03 divulga métodos para el tratamiento de aguas residuales provenientes de distintos tipos de industria, entre ellas la acuicultura y la industria del procesado de marisco. El método utiliza microorganismos para la obtención de distintos productos, como el etanol.

En el estado de la técnica ya es conocido que el hongo *Metarhizium anisopliae* (tb denominado *Entomophthora anisopliae*) es capaz de utilizar quitina como única fuente de nutrientes. También es conocido en el estado de la técnica la obtención de bioetanol mediante fermentaciones de distintas materias primas realizadas por microorganismos. Sin embargo, no se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica la utilización de quitosano o una fuente de quitosano como materia prima para la producción de bioetanol utilizando el hongo *Metarhizium anisopliae*, ni hay indicios en los documentos citados del estado de la técnica que lleven al experto en la materia a utilizar dicho hongo para la obtención de bioetanol.

Por lo tanto, ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-7. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-7. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-7 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).