

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 582**

21 Número de solicitud: 201530895

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:

25.10.2016

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 Beauveria bassiana**

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 al menos uno de los siguientes hongos: Beauveria bassiana y al uso de dicho hongo para la degradación de residuos marisqueros, obteniendo además biomasa fúngica para su uso agrobiotecnológico.

ES 2 587 582 B2

DESCRIPCIÓN

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

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 *Beauveria bassiana*.

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 aminos 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 *Beauveria bassiana* como organismo productor de etanol a

30 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 del hongo *Beauveria bassiana*

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 *Beauveria bassiana* para la producción de etanol a partir de quitosano.

20 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de, *Beauveria bassiana* 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. *B. bassiana* 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 *B. bassiana* para la producción de bioetanol, con otros microorganismos.

30 2. *B. bassiana* tiene la capacidad de producir 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. *B. bassiana* presenta la capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas empleando el quitosano como única fuente de carbono.
4. *B. bassiana* presenta la capacidad de degradación del quitosano en anaerobiosis..
5. *B. bassiana* presenta la capacidad de tolerar etanol en el medio de cultivo.
- 5 6. *B. bassiana* presenta en su genoma, alcohol deshidrogenasas dependientes de zinc y piruvato descarboxilasas necesarias para la producción de etanol.
7. *B. bassiana* presenta la capacidad de producir etanol a partir de quitosano, un residuo abundante de la industria marisquera, cuya fuente principal son los exoesqueletos de los crustáceos, en condiciones anaeróbicas.

10 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra el crecimiento en medio líquido de *B. bassiana* con quitosano (0, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 mg ml⁻¹) como única fuente de nutrientes.

Figura 2. Muestra la capacidad degradadora de quitosano por parte de *B. bassiana* 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 al diámetro de la colonia del hongo (C).

Figura 3. Muestra la apariencia de las colonias de 15 días de *B. bassiana* 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.

Figura 4. Muestra la producción de azúcares reductores por parte de *B. bassiana* 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.

25 Figura 5. Muestra la producción de azúcares reductores por *B. bassiana* en medio líquido con 0, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 mg ml⁻¹ de quitosano en condiciones anaerobias.

Figura 6: Muestra el crecimiento de *B. bassiana* 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*.

5 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.

10 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*.

15 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.

20 Figura 11: Muestra la producción de etanol por *B. bassiana* 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 *B. bassiana* 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.

30 **EJEMPLO 1: Crecimiento de *B. bassiana* en quitosano y degradación de este sustrato como única fuente de nutrientes**

Se analizó la capacidad de crecimiento de *Beauveria bassiana* utilizando quitosano como único nutriente, en medio líquido o sólido. El aislado de *Beauveria bassiana* usado en los

modos de realización de la presente invención, fue la cepa 53 (depositada en la CECT con el número de referencia 20927) aislada del lepidóptero *Rhizotrogus chevrolatti* en Setúbal (Portugal).

5 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
10 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 cepa de *B. bassiana* se cultivó en placas de Petri con medio de cultivo agar extracto de maíz (CMA) a una temperatura de 25°C y se resembraron cada 30 días. Para los ensayos realizados en líquido, transcurridos entre 20-30 días, los conidios y clamidosporas, se
15 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 10⁶ 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
20 quitosano, se inocularon con conidios *B. bassiana* y se cargaron 12 alicuotas 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
25 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 *B. bassiana* fue capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones de quitosano como única fuente de nutrientes. (Figura 1).

30 *B. bassiana* es un hongo resistente a quitosano, capaz de degradar este compuesto. Los ensayos de crecimiento de *B. bassiana* 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 *B. bassiana* usando un sacabocados. Se midió

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 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 de *B. bassiana* en anaerobiosis y la degradación de quitosano fue similar en 5
10
aero/anaerobiosis (Figura 2).

EJEMPLO 2: Producción de azúcares reductores por parte *B. bassiana* en presencia de quitosano

Con el objetivo de medir la producción de azúcares reductores por parte de *B. bassiana* 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 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, 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 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 *B. bassiana* en presencia de etanol.

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, *B. bassiana* como en el Ejemplo 1, utilizando un sacabocados. El crecimiento del hongo se midió diariamente y se construyeron curvas de crecimiento (Figura 6). *B. bassiana* es capaz de crecer hasta un 3%

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

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 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 reesei*, *Claviceps purpurea*, *Cordyceps militaris*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. El alineamiento se realizó empleando 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 *B. bassiana* en presencia de quitosano.

Con el objetivo de comprobar la producción de etanol a partir de *B. bassiana* 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 *B. bassiana* 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
5 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, *B. bassiana* produce etanol a partir del día 4, los valores de
10 producción obtenidos se encuentran entre el 0.25 y 0.75% en cultivos con 0.5 y 0.75 mg/ml de quitosano..

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de bioetanol a partir de una fuente de quitosano que comprende el uso del hongo *Beauveria bassiana*.
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 *Beauveria bassiana* para la producción de etanol a partir de quitosano.
7. Uso de *Beauveria bassiana* para la degradación de residuos marisqueros y obtención de biomasa fúngica y bioetanol.

15

FIG. 1

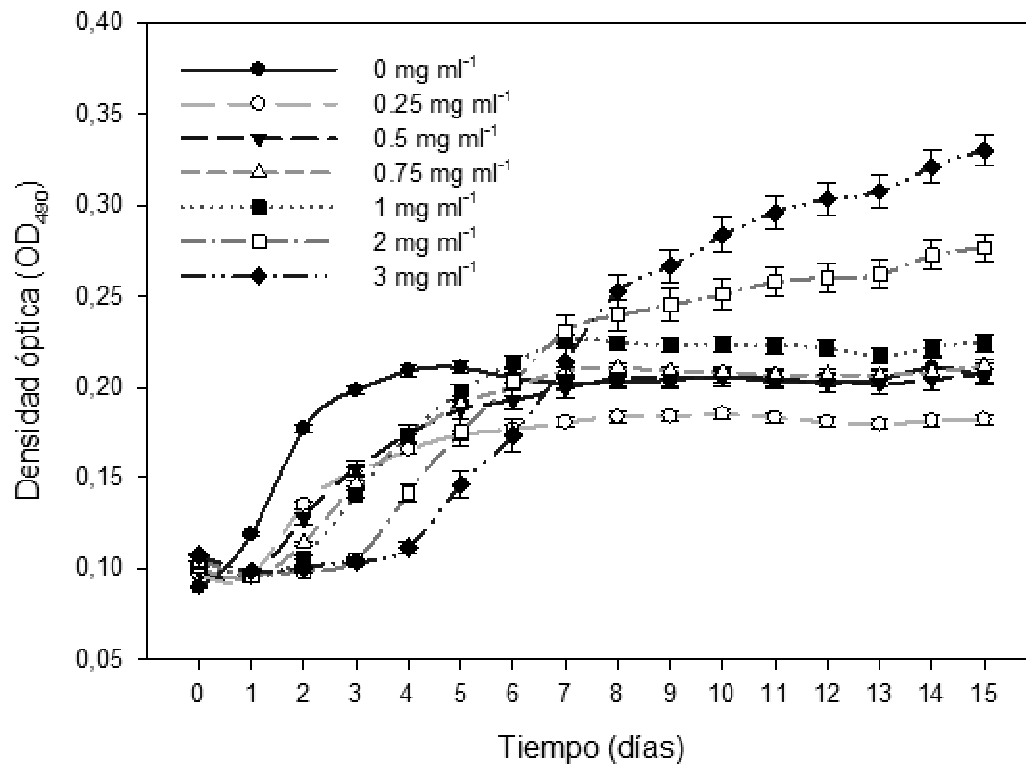


FIG. 2

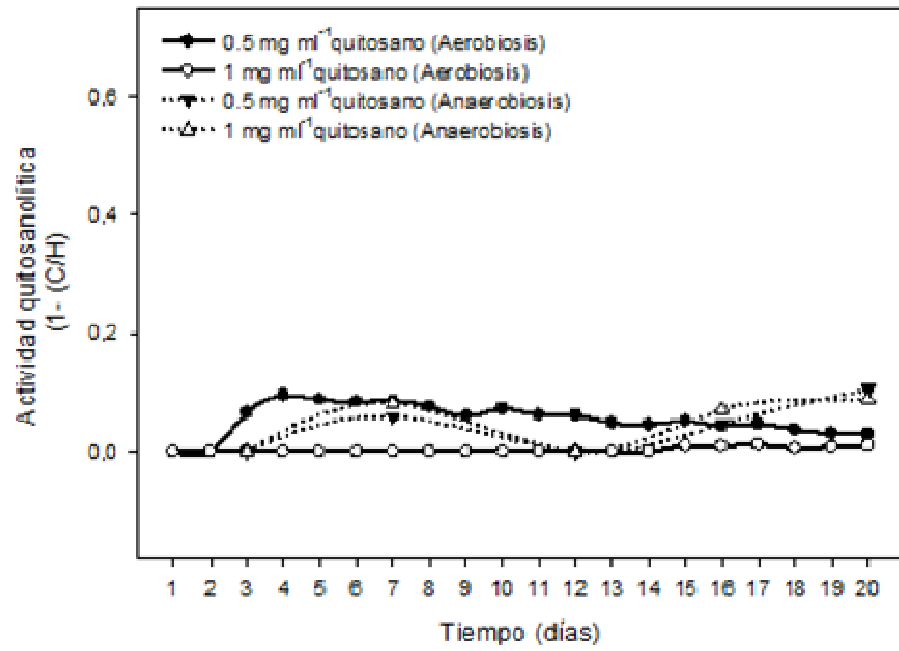


FIG. 3

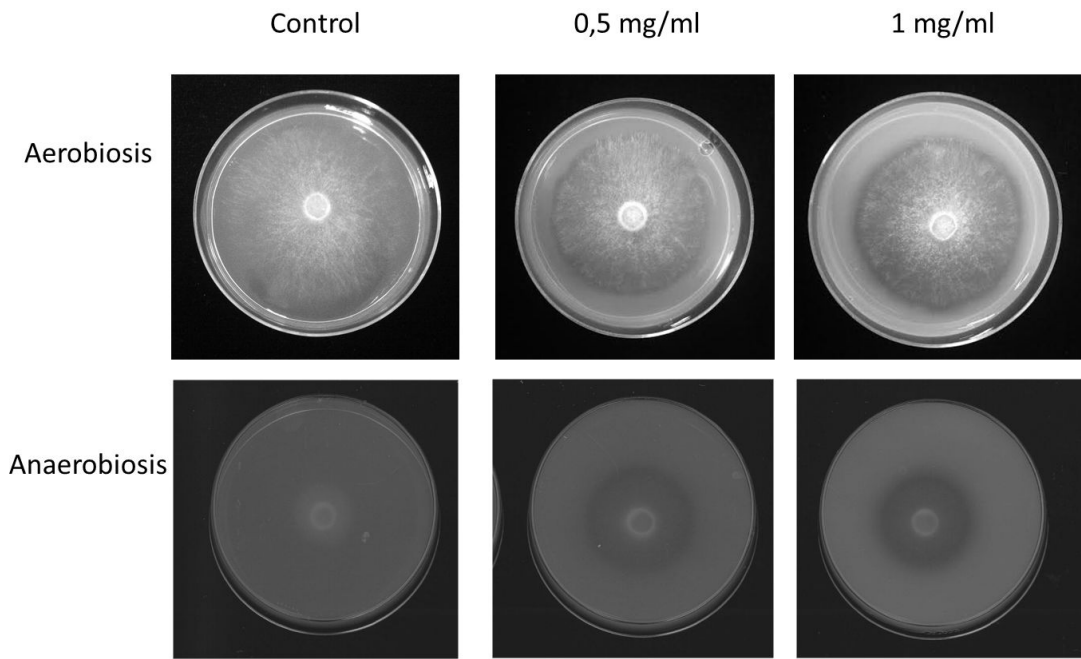


FIG. 4

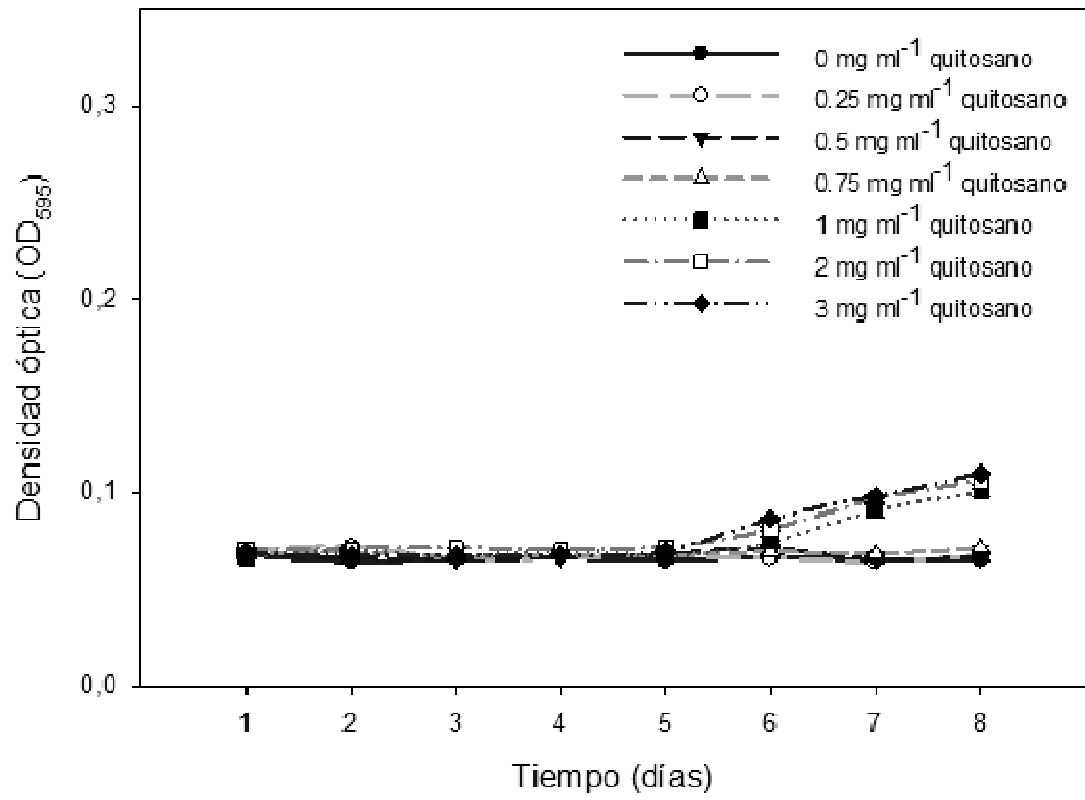


FIG. 5

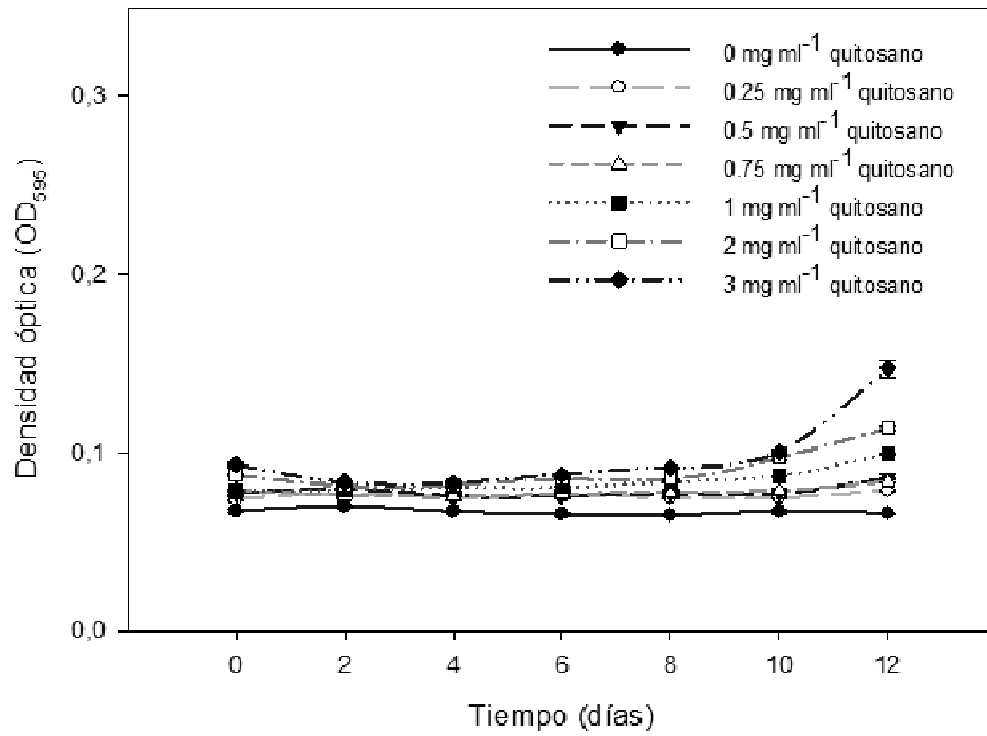


FIG. 6

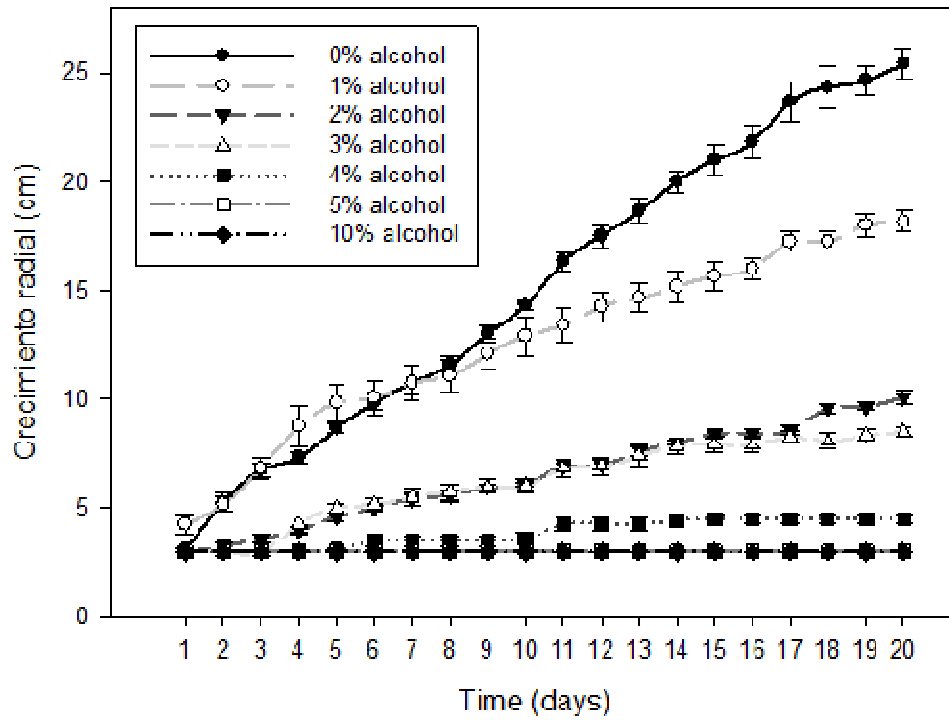
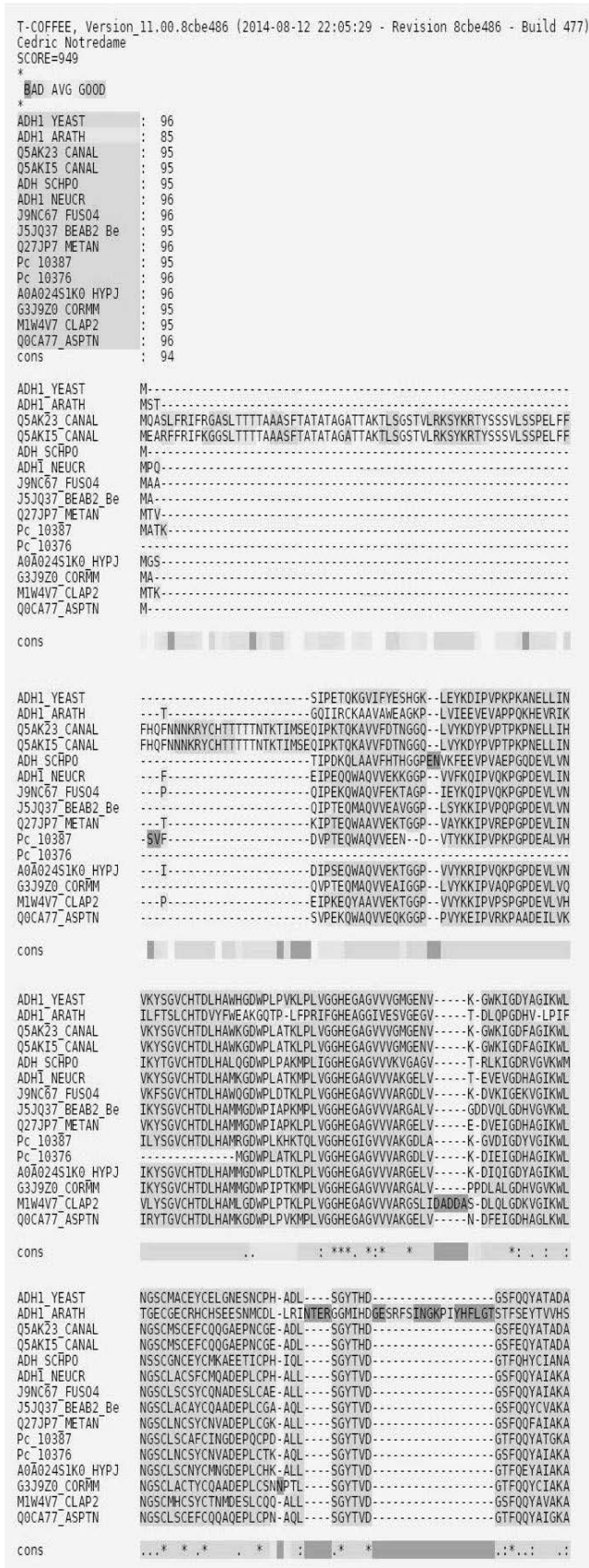


FIG 7



ADH1_YEAST VQAAPHTPOGTDLAQVAPILCAGITVYK--ALKSANLMAGHWVAISGAAGGLGSLAVQYAKAMG
 ADH1_ARATH GQVAKINPDAPLDKVCIVSCG-LSTGLGATLNVAKPKKGGQSVAFGLGA-VLGAEGGARIAG
 Q5AK23_CANAL VQAAPHTPOGTDLANVAPILCAGITVYK--ALKTADLAAGOWVAISGAGGGLGSLAVQYARAMG
 Q5AK15_CANAL VQAAPHTPOGTDLANVAPILCAGITVYK--ALKTADLAAGOWVAISGAGGGLGSLAVQYARAMG
 ADH_SCHPO THATIIPESVPLEVAAPIMCAGITCYR--ALKESKVGPEWICIPGAGGGLGHLAVQYAKAMA
 ADH1_NEUCR AHVAKIPKGCDELLETTAPVLCAGITVYK--GLKESGVRPQGCVAIVGAGGGLGSMAIQYANAMG
 J9NC67_FUSO4 IHVARIPKECDLESISPLCAGITVYK--GLKESGVKAGOSIAIVGAGGGLGSLAVQYCKAMG
 J5JQ37_BEAB2_Be AHVARIPKCDLEAIAPLLCAGITVYK--GLKESGARAGOSVIVGAGGGLGSLACQYARAMG
 Q27J37_METAN AHVARIPKCDLEAIAPLLCAGITVYK--GLKESGAQPQGSVAIVGAGGGLGSLACQYAKAMG
 Pc_10387 MHLTQIPKDCDLAAAPILCAGITVYK--GLKESGARPAQFVAVIGAGGGLGSLAIQYAKAMG
 Pc_10376 AHVARIPKCDLEAIAPLLCAGITVYK--GLKESGAKAGESVAIVGAGGGLGSLACQYAKAMG
 A0A02451K0_HYPJ AHVARIPKCDLESVAPILCAGITVYK--GLKESLARPQGTIAVVGAGGGLGSLALQYAKAMG
 G3J9Z0_CORMM AHVARIPKCDLEAVAPILCAGITVYK--GLKESGAKAGOSVIVGAGGGLGSLACQYARAMG
 M1W4V7_CLAP2 AHVARIPADCDLEAVAPILCAGITVYK--GLKESGARAGQTVAVIGAGGGLGCFAIQYAKAMG
 Q0CA77_ASPTN ALASKIPKNVPLDAVAPILCAGITVYK--GLKESGARPQGTVAIVGAGGGLGSLALQYAKAMG

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

ADH1_YEAST -YRVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVDFIDFTKE-KDIVGAVLKATD-G-GAHGVINVSVEAAIE
 ADH1_ARATH SRRIIGVDFNSKRFDAQEFGVTECVNPKDH-DKPIQQVIAEMTDG-GVDRSVECTGSOAMI
 Q5AK23_CANAL -LRVVAIDGGDEKGEFVKSLGAEAYVDFTKD-KDIVEAVKKATD-G-GPHGAINVSVEKAID
 Q5AK15_CANAL -LRVVAIDGGDEKGEFVKSLGAEAYVDFTKD-KDIVEAVKKATD-G-GPHGAINVSVEKAID
 ADH_SCHPO -MRVAIDTGDOKAELVKSFGAEVFLDFKKE-ADMIEAVKAATN-G-GAHGTLVLTSPKSYE
 ADH1_NEUCR -LHAIAIDGGEEKGNKRELGAQAYVDFTTT-KDLVADVKAATPDGLGPHAVLLVAVEKPFH
 J9NC67_FUSO4 -IHAIAIDGGEEKGKTKELGATAYVDFTTT-KNLVADVKATSDGLGPHAAALLVATNEKPFQ
 J5JQ37_BEAB2_Be -LRVIGIDTGDOKRALVOSYGAD-FVDFRFS-KDIVSETRALTPDGLGAHAALLVAOEGPFQ
 Q27J37_METAN -LNIIAIDAGDEKRDMLGADVDFVDFMFS-TDLVAEVKAASADGLGPHAVLLVAVEKPFQ
 Pc_10387 -LRTIAVDAGEAKGKFCSTLGDADAYVDFTKS-NDLVKDIIKAATDGLGPHAAALLVAEKEKPFH
 Pc_10376 -FKIIAIDAGAEEKDMCMKLGADTFVDFTTT-KDLVSEVKAASNDGOGPHAVLLVAVEKPFQ
 A0A02451K0_HYPJ -LRSIAIDAGDEKRDMLGASAFVDFSTT-KDLVADVKAATPDGEGPHAAALLVAEKEKPFQ
 G3J9Z0_CORMM -LRVIGVDTGADKQALVOSYGCDFVDFMFS-KDLVADVKALTPDGLGAHAALLVAEKEKPFQ
 M1W4V7_CLAP2 -LHVVAIDGGAEKRLCLELGAASYVDFMESGSLVEDVKRASVDGLGPHAVLLVAANEKPFQ
 Q0CA77_ASPTN -LRAVAIDGGEEKRQMCQSLGAEAYVDFFAAS-QNVVVDVKAATPDGGLGAHAALLVAEKEKPFQ

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

ADH1_YEAST ASTRYVR-ANGTTVLVGMAGAKCCSDVFNQVVKISIVGSYVGNRADTRE---ALDFFAR--
 ADH1_ARATH QAFECVHDGQWVAVLVGVPKDDAFKTHPMFLNERTLKGTFFGNYKPTDIPGVVEKYMNKE
 Q5AK23_CANAL QSVEYVR-PLGKVVVLVGLPAHAKVTAPVFDVAVVKSIEIKGSYVGNRKTAE---AIDFFSR--
 Q5AK15_CANAL QSVEYVR-PLGKVVVLVGLPAHAKVTAPVFDVAVVKSIEIKGSYVGNRKTAE---AIDFFSR--
 ADH_SCHPO QAAGFAR-PGSTMVTVSMPAGAKLGADIFMLTVKMLKICGSHVGNRIDSIE---ALEYVSR--
 ADH1_NEUCR QAQDYVR-SRGTIICIGLPAAGAKFQAPVFDVIRMIITIKGSYVGNRQDTQE---ALDFFAR--
 J9NC67_FUSO4 QATQYIR-SRGTVVVICGLPANAQFSAPVFDVVRMISIKGSYVGNRADTAE---AIDFFRR--
 J5JQ37_BEAB2_Be QATQYVR-SRGVVVICGLPADAHFKAPVFDVLRMIQIRGSYVGNRRDTAE---AIEFYRK--
 Q27J37_METAN QATQYVR-SRGVVVICGLPANAKSAPVFDVIRMINIKGSYVGNRADTAE---AIEFYRR--
 Pc_10387 QATEYVR-PRGTVVVGVMPKEAQIKASVFDVVRMLSIKGSYVGNRADANE---AVEIFRA--
 Pc_10376 QATQYVR-SRGVVVICGLPADAKLSAPVFDVIRMINIKGSYVGNRADTAE---AIEFYRR--
 A0A02451K0_HYPJ QATEYLR-SKGVLCIGLPAGARLSAPVFDVIRMIITIKGSYVGNRADTQE---ALDFFRR--
 G3J9Z0_CORMM QATQYVR-SRGVVVICGLPADAHFKAPVFDVLRMIQIRGSYVGNRLDSAE---AIEFFRL--
 M1W4V7_CLAP2 QATQYVR-AHGTVVVICGLPANANFSAPVFDVVRMISIKGSYVGNRADTAE---ALDFFAR--
 Q0CA77_ASPTN QAADYVR-SRGTIVVICGLPANAFKAPVFDVIRMINIKGSYVGNRQDQVE---AIDFFAR--

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

ADH1_YEAST -GLVKSPKVVGLSTLPEIYKMEKGOIVGRYVVDTSK
 ADH1_ARATH LELEKFIHTVPPFSEINKAFDYMLKGESI-RCIITMGA
 Q5AK23_CANAL -GLIKCPTIKIVGLSDLPEVFKLMEEGKILSRVLDTS
 Q5AK15_CANAL -GLIKCPTIKIVGLSDLPEVFKLMEEGKILGRVLDTSK
 ADH_SCHPO -GLVKPYKVPFSTLPDQVYRLMHNKIAGRIVLDLSK
 ADH1_NEUCR -GLIKVPTKTIVGLSKLQEVYDLMEEGKIVGRYVVDTSK
 J9NC67_FUSO4 -GLIKVPTKTIVGLSELNEVYKLMKAGQIVGRYVVDTSR
 J5JQ37_BEAB2_Be -GLVKVPYKVVGLSELPAVYDLMKAGQITGRVLDTSR
 Q27J37_METAN -GLINAPFKTVGLSQLQDQVYELMKEGKIAGRYVVDTSK
 Pc_10387 -GLVKAPVTVVGLSKLSEVDFAMASGDIIGRYVLDTSK
 Pc_10376 -GLINAPFKTVGLSQLQDQVYELMKEGKIAGRYVVDTSK
 A0A02451K0_HYPJ -GLITVPTKTIVGLSQLQDQVYELMHEAKIAGRYVVDPTR
 G3J9Z0_CORMM -GLIKVPTKTIVGLSELPTVYDLMRAGKITGRYVLDMSR
 M1W4V7_CLAP2 -GLIKVPTKTIVGLSELQDQVYKLMSEGKIAGRYVVDTSK
 Q0CA77_ASPTN -GLIKAPFKVAPLKDLPKIFELMEQKGIAGRYVLDVPQ

cons * . : : : * . * : :

FIG. 8

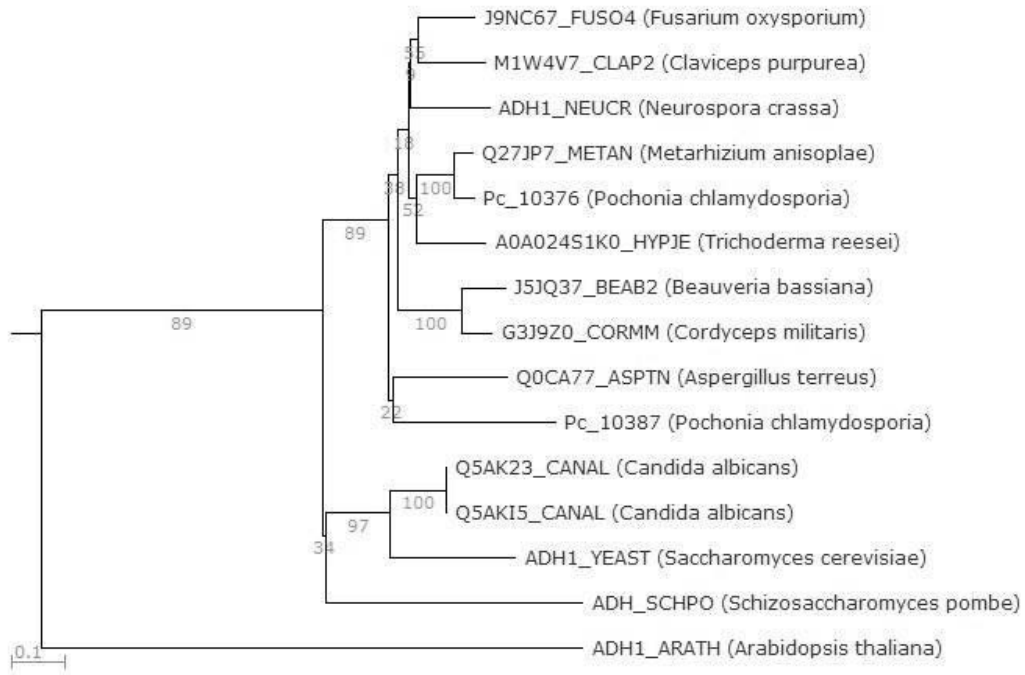


FIG. 9

```

T-COFFEE, Version_11.00.8cbe486 (2014-08-12 22:05:29 - Revision 8cbe486 - Build 477)
Cedric Notredame
SCORE=966
*
AD: AVG GOOD
*
PDC1 YEAST S.ce : 96
PDC4 SCHO S. : 96
Pc_2054 Pochoni : 97
PDC1 CANAL Cand : 96
Q754N8 NEUCR N. : 97
J9MZ02 FUS04 Fu : 97
J4UF02 BEAB2 Be : 97
E9EW0 METAR Me : 97
PDC2 ARATH A.th : 92
G3J309 CORMM : 96
M1W5H2 CLAP2 : 97
G0RHV1 HYPJQ : 97
PDC_ASPTN : 96
cons : 96

PDC1 YEAST S.ce MS---E-----:ITL GKYL FERLKO
PDC4 SCHO S. MS---S-----:EK-VL VGEYL FTRLLO
Pc_2054 Pochoni MT---DLRVQS---:LRSP-IDVSEYL FRRLYE
PDC1 CANAL Cand MS---E-----:ITLGRFFFRRLHQ
Q754N8 NEUCR N. MS---DIRTOS---:LQKP-VTVAEYL FRRLHQ
J9MZ02 FUS04 Fu MS---N---SN---:LQKP-IDVVAEYL FRRLYE
J4UF02 BEAB2 Be MT---DIRVNN---:LKAP-VDVVAEYL FRRLYE
E9EW0 METAR Me MA---DIRVOS---:LRKP-IDVSEYL FRRLYE
PDC2 ARATH A.th MD---T-KIGSIDACNPTNHDI GPPNGGVSTVONT SPLHSTTVSPD ATLG RYLARLVE
G3J309 CORMM MEPRTADIRVRN---:LKKP-VDVVAEYL FRRLHE
M1W5H2 CLAP2 M---DIRVKS---:LERP-MDVSEYL FRRLHE
G0RHV1 HYPJQ MT---NIREOS---:LEOP-VDVVAEYL FRRLHE
PDC_ASPTN MA---TDIATKE---:LHKP-VDVVAEYL FRRLYE

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

PDC1 YEAST S.ce VVNVTVFGLPGDFNL SLLDKI- YEVE---GHRWAGNANELNAAYAADGYARIK--GMSCIITT
PDC4 SCHO S. LGIKSILGVPGDFNLALDLI-EK-VGDETFRWVGNENELNGAYAADYARVK--GISAITVT
Pc_2054 Pochoni VGVRSVHGVPGDYNLVALDCL-PK-C---GLRWVGSVNELNAAYAADGYARVK--DIGALITT
PDC1 CANAL Cand LKVDTVFGLPGDFNLALDKT- YEVE---GHRWAGNANELNAAYAADGYARVNDIGLSALVST
Q754N8 NEUCR N. IGVRSVHGLPGDFNLVALDYV-PK-A---GLKWVGSVNELNAAYAADGYARAK--GISALVTT
J9MZ02 FUS04 Fu VGVRSVHGVPGDYNLVALDYL-PQ-C---NLKWVGSVNELNAAYAADGYARIT--KMAALITT
J4UF02 BEAB2 Be IGVRSVHGVPGDYNLVALDYL-PK-A---NLKWVGSVNELNAAYAADGYARIN--TVGALITT
E9EW0 METAR Me VGVRSVHGVPGDYNLVALDYL-PK-S---GLKWVGSVNELNAAYAADGYARVK--DIGALLTT
PDC2 ARATH A.th IGVTVDFSPGDFNL TLDHLBAE-P---NLKLGCCNELNAAYAADGYARSR--GVGACVVT
G3J309 CORMM VGVRSVHGVPGDYNLVALDYL-PK-A---GLKWVGSVNELNAAYAADGYARIK--TI GALTVT
M1W5H2 CLAP2 VGVRSVHGVPGDYNLVALDYL-PQ-V---GLKWVGSVNELNAAYAADGYARVN--GIGALITT
G0RHV1 HYPJQ IGVRSVHGLPGDYNLIALDYL-PT-C---GLKWVGSVNELNAAYAADGYARVK--QMGALITT
PDC_ASPTN VGVRAVHGVPGDYNLAALDYL-PK-C---GLHWVGNCELNAAYAADGYARIN--GISALVTT

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

PDC1 YEAST S.ce FGVGELSALNGIAGSYAEHVGLHVVGVPSISAQAKQLLHHTLGNDFTVFHRMSANISETT
PDC4 SCHO S. FGVGELSALNGFAGAYSERIPVHVIVGVPNTKAQATRP LHHHTLGNDFKVFQRMSELSADV
Pc_2054 Pochoni FGVGELSAINGVAGAFSEHIPVHVIVGVPSTLSQRDGM LHHHTLGNDFNVFANMSAQISCDV
PDC1 CANAL Cand FGVGELSALNGIAGSYAEHVGLHVVGVPSISAQAKQLLHHTLGNDFTVFHRMKNISQTS
Q754N8 NEUCR N. FGVGELSAINGVAGAFSEHIPVHVIVGVPSTISQRNGMLLHHTLGNDFNVFANMSAINCDV
J9MZ02 FUS04 Fu FGVGELSAINGVAGAFSEHIPVHVIVGVPSTISQRDGM LHHHTLGNDFNVFANMSAQISCDV
J4UF02 BEAB2 Be FGVGELSALNGIAGSYAEHVGLHVVGVPSISQRDGM LHHHTLGNDFNVFANMSHAINCNV
E9EW0 METAR Me FGVGELSAINGVAGAFSEHIPVHVIVGVPSTLSQRDGM LHHHTLGNDFNVFANMSAQISCDV
PDC2 ARATH A.th FTVGGLSVLNAIAGAYSENPLTICIGVGPNSNDYGTNRILHHTLGLPDTQLRQFAVTCFQ
G3J309 CORMM FGVGELSAINGLAGAYSEHIPVHVIVGVPSTHSQRDGM LHHHTLGNDFNVFANMSAINCNV
M1W5H2 CLAP2 FGVGELSAINGLAGAFSEHIPVHVIVGVPSTISQRNGMLLHHTLGNDFNVFANMSAINCDV
G0RHV1 HYPJQ FGVGELSAINGLAGAYSEHIPVHVIVGVPSTISQRNGMLLHHTLGNDFNVFANMSAEISCDV
PDC_ASPTN FGVGELSALNAIAGAYSEFVPIVHVIVGQPHTRSQRDGM LHHHTLGNDFNVFAMSGGISCAM

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

PDC1 YEAST S.ce AMITDIATAPAEIDRCIRTTYTORPVYVGLPANLVDLNV- AKLLQTPIDMSLKPNDAESEK
PDC4 SCHO S. AFLDSGDSAGRLIDNLLCVRTRSRVYLA VPSDAGYFTD-ASPLKTLVPVPENKNIEKH
Pc_2054 Pochoni AKLNSPSEIADIDHALRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GHRLLKPIDLSEPNDEPEKED
PDC1 CANAL Cand AFIADINSAPAEIDRCIRDAVYVYORPVYITLPTDMVQAKVP- KSLDKPIDLSEPNDEPEKED
Q754N8 NEUCR N. AKLVKPSIEIADIDHALRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GARLDTPIDLSEPNDEPEKED
J9MZ02 FUS04 Fu AKLNSPSEIADIDHALRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GARLDTPIDLSEPNDEPEKED
J4UF02 BEAB2 Be AKLNSPDIADIDHALRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GERLETPIDLSEPNDEPEKED
E9EW0 METAR Me AKLNSPDIADIDHALRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GARLDRPIDLSEPNDEPEKED
PDC2 ARATH A.th AVINLEEAEHLIDTAISTALKEKSPVYISCNLPAIPLPTFSRHPVPMKPKVSNQIGLD
G3J309 CORMM AKLNSPDIADIDHALRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GORLETPIDLAEPNSNDEPEKED
M1W5H2 CLAP2 AKLNSPSEIADIDHALRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GARLSOPIDLSEPNDEPEKED
G0RHV1 HYPJQ AKLNSPSEIADIDHALRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GARLDTPIDLSEPNDEPEKED
PDC_ASPTN GRLNETHEVALIDNAIRECFVRSRVPYITLPTDMVQAKVE- GORLDTPIDLSEPNDEPEKED

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

PDC1 YEAST S.ce EYVDITILALVKDAKNPVLADACSRHDVKAETKLDLIDTQFAFVTPMGKGSIDEQHPRYGG
PDC4 SCHO S. EVVSEILELLEKSKNPSILVDACVSRFHITQETODFIDATHFPTVTPMGKTAINESSPYFDG
Pc_2054 Pochoni YVVDVIMKYLNAAKNPVLLVDACAIRHRVLAEVHLEKSNLPTFVTPMGKGAINEQHNHFGG
PDC1 CANAL Cand EVIETVEKLTSEAKNPVLLVDACAIRHRVLAEVHLEKSNLPTFVTPMGKGAINEQHNHFGG
Q754N8 NEUCR N. YVVDVILRYLHGAKNPVLLVDACAIRHRVLEEVHLLAKTLPVFPVTPMGKGAINEQHNHFGG
J9MZ02 FUS04 Fu FVVDVILKAMYAQRNPVLLVDACAIRHRVLEEVHLLAKTLPVFPVTPMGKGAINEQHNHFGG
J4UF02 BEAB2 Be YVVDVILRYLESAKSPVLLVDACAIRHRVLEEVHLLAKTLPVFPVTPMGKGAINEQHNHFGG
E9EW0 METAR Me YVVDVIMKYLNAAKNPVLLVDACAIRHRVLEEVHLLAKTLPVFPVTPMGKGAINEQHNHFGG
PDC2 ARATH A.th AAEEAAAEFLNKAVKPVLLVGGPKMRVAKAADAFVELADASGYGLAVNPSAKGAVPEHHRHTFG
G3J309 CORMM YVVDVILRYLNSAKSPVLLVDACAIRHRVLEEVHLLAKTLPVFPVTPMGKGAINEQHNHFGG
M1W5H2 CLAP2 YVVDVILRYLNSAKSPVLLVDACAIRHRVLEEVHLLAKTLPVFPVTPMGKGAINEQHNHFGG
G0RHV1 HYPJQ YVVDVILKYLRAAKHPVLLVDACAIRHRVLEEVHLLAKTLPVFPVTPMGKGAINEQHNHFGG
PDC_ASPTN YVVDVILKYLHAAKNPVLLVDACAIRHRVLEEVHLLAKTLPVFPVTPMGKGAINEQHNHFGG

cons : : : : : * * : : : * * : : : * * : : : * * :
    
```

```

PDC1_YEAST_S.ce VYVGLSKP-EVKEAVESADLILSVGALLSDFNTGSGFYSYKTKNIVEFHSDHMKIRNA-TFP
PDC4_SCHPO'_S. VYIGSLTEP-SIKERAEOSTLLIIGGLRSDFNSTGFTYATPASOTIEFHSDYTKIRSG-VYE
Pc_2054_Pochoni VYAGNGSHPPEVKDMVSSDILLITIGALKSDFNTAGFSYRTSOLNSIOLHSDHCIVRYS-TYP
PDC1_CAÑAL_Cand VYVGLSKP-EVKEAVESADLILSIGALLSDFNTGSGFYSYKTKNIVEFHSDYTKIROA-TFP
Q7S4ñ8_NEUCR_N. VYAGTGLP-EVAKRVEGSDLVLSIGAIKSDFNTAGFSYHTSOLNTIDLHSDHCTVRYE-EYP
J9M202_FUS04_Fu VFAGDGSHPARAQSVIYESDILLITIGALKSDFNTGFSYRTSOLNSIOLHSDHCIVRYS-TYP
J4UFB2_BEAB2_Bo VYAGEGSPYSVKKFVSSDILLITIGALKSDFNTAGFSYRTSOLNSIOLHSDHCIIHYS-TYP
E9E9V0_METAR_Me VYAGDGSHPPEVKDIVESSDILLITIGALKSDFNTAGFSYRTSOLNSIOLHSDHCIVRYS-TYP
PDC2_ARATH_A.th TYWGAVSTA-FCAEIVESADAYLFAGPIFNQYVSYVGLSKLKKKKAIIIVOPDRVTIGNPAFG
G3J3J9_CORMM VYAGEGSRPYSVKKAVESDILLITIGALKSDFNTAGFSYRTSOLNSIOLHSDHCIIHYS-TYP
MIW5H2_CLAP2 VYAGAGSHPLVVKDIVESSDILLITIGALKSDFNTAGFSYRTSOLNSIOLHSDHCIVRYS-TYP
G0RHV1_HYPJQ VYAGAGSHPPOVKDIVESSDILLITIGALKSDFNTAGFSYRTSOLNTIDLHSDHCIVRYS-TYP
PDC_ASP7N VYAGTGSNP-GVREQVESDILLITIGAIKSDFNTGFSYRIGQLNTIDHSTYVRVRYE-EYP

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

PDC1_YEAST_S.ce GVVMKFLVKLTTIADAAG-GYKPVAVP--ARTPANAAV--PASTPLKQEMMNQLGNFLQE
PDC4_SCHPO'_S. GISMKHLPLKLTAAIDKKSV-QAKARPVPEEPKAVAAEG--YAEGTIHKWFMPFASFRLRE
Pc_2054_Pochoni GVMRGLVKLITASIDPKK-LSVROTRV---RNEVKEHH--DSTTITQSFWMPRLGEFLAD
PDC1_CAÑAL_Cand GVVMKEALQKLLTTVKKSINNYTPVPVP--ETKLINTPA--APSTPLTOELVWTKVSSWFR
Q7S4ñ8_NEUCR_N. GVAMRGLVKRVTERTIDMSK-LSTPPSPV---ENAVAEHR--DQSQAIIQAFWPRVGEYFOE
J9M202_FUS04_Fu GVAMRGLVKRLIDRDVPKSM-PAPSPEV---RNEVEKHT--DDESIITQAFWPRVGEYELIP
J4UFB2_BEAB2_Bo GARMKGLVRLINDAMPSKL-SVTQALAF---KNEVOEND--DGPPTIIQAFWPRVGEFFAK
E9E9V0_METAR_Me GVVMKGLVQVYKRIDPKQL-NIRASPAV---RNEAREHH--DGSATIIQAFWMPRLGEFLTD
PDC2_ARATH_A.th CVLMKDFLSSEAKRKHMM-SYENYHRI-YVPEKPLRD--NPNESLRVNLFOHONIMLSS
G3J3J9_CORMM GARMKGLVRLIDALDPSQL-FITQVAV---KNQVAND--DGPPTISQAFWPRVGEFFAK
MIW5H2_CLAP2 GTRMKGLVKLITAKIQAOL-NIRPTV---PRGAQPSH--DGSPTIIQAFWMPRLGEFLRE
G0RHV1_HYPJQ GVAMRGLVROVIKKINOSL-SVQPSPTV---ENEVTKNL--DQSSVITQAFWPRVGEFLRK
PDC_ASP7N DINMKGLVLRVQRMGHV---NALPVQRL---SNALPDNEKQSSSQEITHAWLWPIVGQMLKE

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

PDC1_YEAST_S.ce GDVVIAETGTSAGFINOTTFPNNTYGISQVWLSGIGFTTGATGAFAAEI0-PKKRVLFI
PDC4_SCHPO'_S. SDVVITTEGTSNFGLDCIFPKGCONLSQVWLSGIGSWVGAMFGATLGIKSDAPRRSILIV
Pc_2054_Pochoni QDIVITETGTANFGIWDTKFPVGSALSQVWLSGIGSWVGAQGAALAAKDMG-VERRTILFV
PDC1_CAÑAL_Cand GDIIITTEGTSAGFIVSRFPKNSIGISQVWLSGIGSYTGATGAAMAQELD-PKKRVLFI
Q7S4ñ8_NEUCR_N. GDVVITTEGTANFGIWRFPKNSIGISQVWLSGIGSWVGAQGAALAVKDEL-QDRRTLFLV
J9M202_FUS04_Fu NDIVVITTEGTANFGIWRFPNRYVALSQVWLSGIGSWVGAQGAALAAKDG-KEGRTLFLV
J4UFB2_BEAB2_Bo DDIVVITTEGTANFGIWRFPKNSIGISQVWLSGIGSWVGAQGACMAKDMG-SKRRTLFLV
E9E9V0_METAR_Me NDIVVITTEGTANFGIWRFPKNSIGISQVWLSGIGSWVGAQGAALAAKDMG-EKRRTLFLV
PDC2_ARATH_A.th ESALVETGTSNFGICLQKLPPEGCYEQMYSIGSWVGAQGAALAAKDMG-PNRVIAIC
G3J3J9_CORMM DDIVVITTEGTANFGIWRFPAGVTALQVWLSGIGSWVGAQGAALAAKDMG-SKRRTLFLV
MIW5H2_CLAP2 EDIVVITTEGTANFGIWRFPAGVTALQVWLSGIGSWVGAQGAALAAKDMG-RDRRTLFLV
G0RHV1_HYPJQ NDIVVITTEGTANFGIWRFPAGVTALQVWLSGIGSWVGAQGAALAAKDG-SRRTLFLV
PDC_ASP7N RDIVVITTEGTANFGIWRFPANVTALQVWLSGIGSWVGAQGAALAAKEQ--NRRRTLFLV

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

PDC1_YEAST_S.ce GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PYFVFLNNDGYTIEKLIHGPKAQYNEIQ-GNDHLSPFTF-
PDC4_SCHPO'_S. GDGSLHLTVQEISATIRNGLP-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
Pc_2054_Pochoni GDGSLQLTVQEISTMIRHGLN-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
PDC1_CAÑAL_Cand GDGSLQLTVQEISTMIRHGLN-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
Q7S4ñ8_NEUCR_N. GDGSLQLTVQEISTMIRHGLN-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
J9M202_FUS04_Fu GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
J4UFB2_BEAB2_Bo GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
E9E9V0_METAR_Me GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
PDC2_ARATH_A.th GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
G3J3J9_CORMM GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
MIW5H2_CLAP2 GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
G0RHV1_HYPJQ GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-
PDC_ASP7N GDGSLQLTVQEISTMIRHGLK-PIIFVICNGYTIERFIHGMADYNDIY-KWIDNGLVDFV-

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

PDC1_YEAST_S.ce GAKD--YETHRVATTGKDELTDQKSNFNDNSKIRMIEIHLVDFAPQNLVEQAKLTAATNAQ
PDC4_SCHPO'_S. GAKN--SRSYNHSEKELLDLFKDEEFKADVIQLEVEHMPVLDAPRVLTEQAKLTASLNKQ-
Pc_2054_Pochoni GGSG-KARKVAVRTKDELNLLVDPTFKAAEKMDFVEVHPKDDAPRALVMTAEASAKTNAEK
PDC1_CAÑAL_Cand NAKD--YETKRISTVKGELNLDLFAKFAVPKIRHVEVPLPTMDAPRNLVAAKLSKTNAEQ
Q7S4ñ8_NEUCR_N. GAKDQSKVFVKTKDELEKLDKDKDFNEVKGLQFVFLVPRDDAPRALVMTAEASAKTNAEK
J9M202_FUS04_Fu GGEK-TCKTFQIKTKTELNELLTNKEFNAECLQFVFLVPRDDAPRALVMTAEASAKTNAEK
J4UFB2_BEAB2_Bo GGSN-TAAKHVKTKSELKELLDTSDFNSADLQFVFLVPRDDAPRALVMTAEASAKTNAEK
E9E9V0_METAR_Me GGOG-KAKFAVKTKDELNELLAKPSFNAANELQLVEVYHPKDDAPRALVMTAEASAKTNAEK
PDC2_ARATH_A.th NGEG-KCVTAKVRCIEELVKAINATNEEKSEFCFIEVIVHKDDTSKELLEWGSVSAANSRP
G3J3J9_CORMM GGSK-TCAKHVKTKSELNLLTDSDFNSADLQFVFLVPRDDAPRALVMTAEASAKTNAEK
MIW5H2_CLAP2 GGTE-LAKKYSVETKDELESLFADPTFNAAREMDFVFLVPRDDAPRALVMTAEASAKTNAEK
G0RHV1_HYPJQ GGSK-TCKFAVKTKDELNELLKDPNSFNAECLQFVFLVPRDDAPRALVMTAEASAKTNAEK
PDC_ASP7N GAKD-KYKGYRVTKRELETKLFANDEFNSVPLQQLVELHMPRDDAPRALVMTAEASAKTNAEK

cons . : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

PDC1_YEAST_S.ce ----
PDC4_SCHPO'_S. ----
Pc_2054_Pochoni ---Q
PDC1_CAÑAL_Cand ----
Q7S4ñ8_NEUCR_N. EDEQ
J9M202_FUS04_Fu ---H
J4UFB2_BEAB2_Bo ---N
E9E9V0_METAR_Me ---E
PDC2_ARATH_A.th PNPQ
G3J3J9_CORMM ---S
MIW5H2_CLAP2 ---E
G0RHV1_HYPJQ ---E
PDC_ASP7N ----

cons . : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

FIG. 10

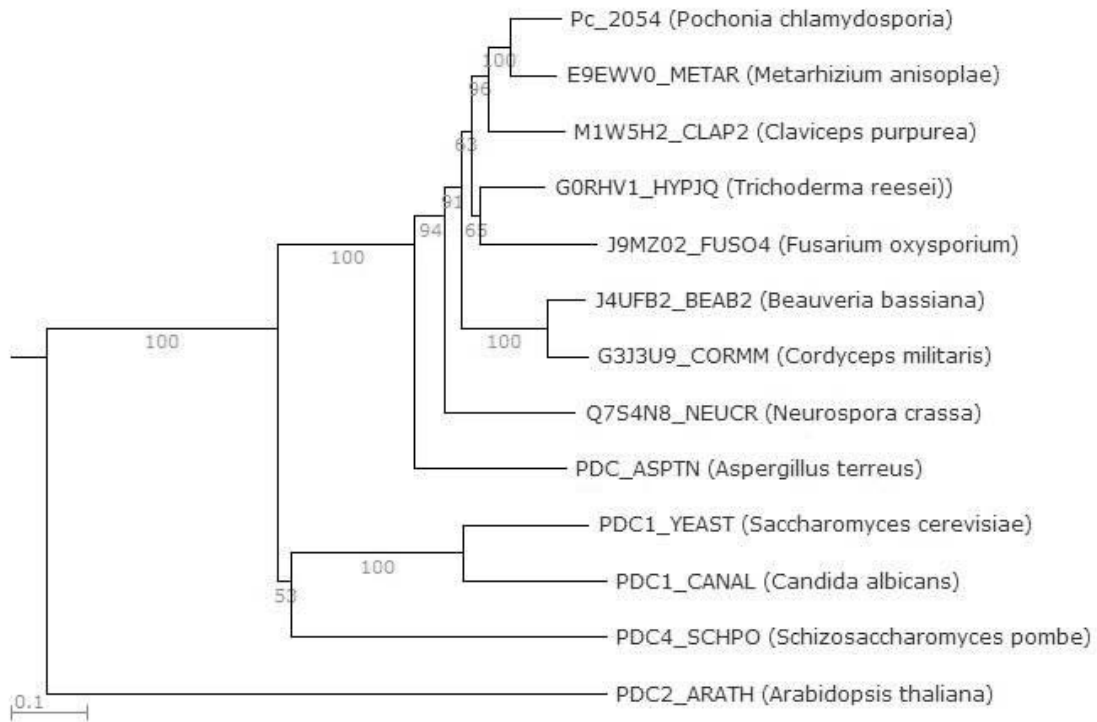
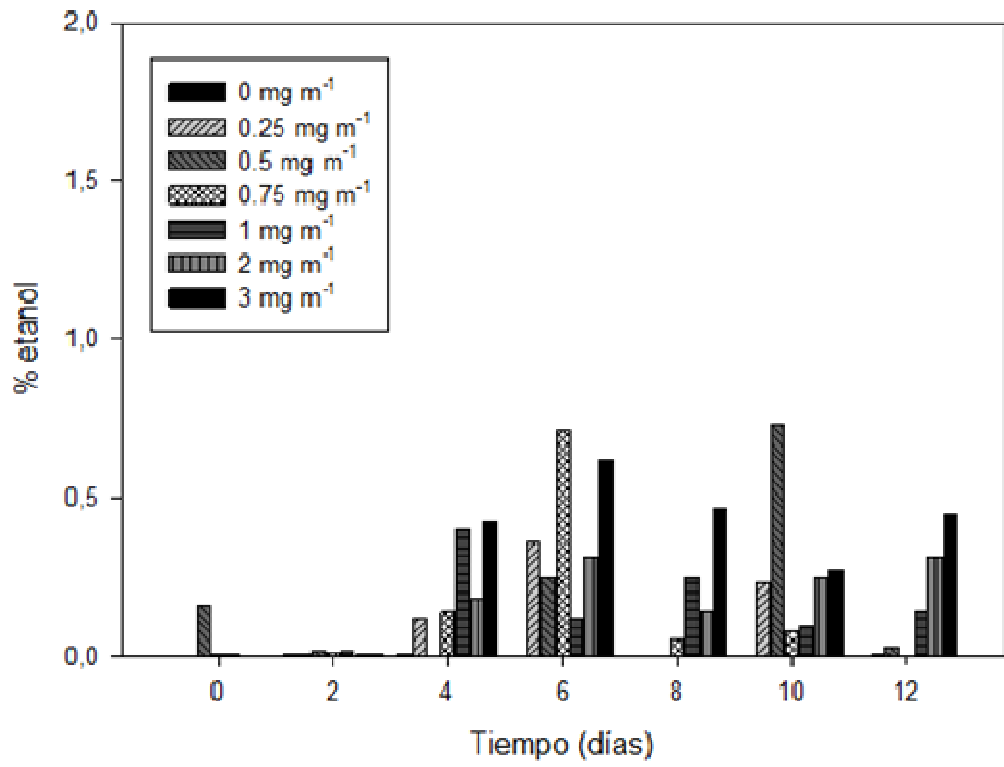


FIG. 11





②① N.º solicitud: 201530895

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	ST LEGER RAYMOND J et al. "Characterization and ultrastructural localization of chitinases from <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>M. flavoviride</i> , and <i>Beauveria bassiana</i> during fungal invasion of host (<i>Manduca sexta</i>) cuticle." <i>Applied and Environmental Microbiology</i> 1996 VOL: 62 No: 3 Págs: 907-912 ISSN 0099-2240; todo el documento.	1-7
A	SURESH P V et al. "Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus <i>Beauveria bassiana</i> by solid state fermentation." <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> Oct., 1998 (10.1998) VOL: 14 No: 5 Págs: 655-660 ISSN 0959-3993; todo el documento.	1-7
A	SANCHEZ O J et al. "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks." <i>BIORESOURCE TECHNOLOGY</i> , 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
29.06.2016

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: 29.06.2016

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	ST LEGER RAYMOND J et al. "Characterization and ultrastructural localization of chitinases from <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>M. flavoviride</i> , and <i>Beauveria bassiana</i> during fungal invasion of host (<i>Manduca sexta</i>) cuticle." Applied and Environmental Microbiology 1996 VOL: 62 No: 3 Págs: 907-912 ISSN 0099-2240.	30.11.1995
D02	SURESH P V et al. "Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus <i>Beauveria bassiana</i> by solid state fermentation." World Journal of Microbiology and Biotechnology Oct., 1998 (10.1998) VOL: 14 No: 5 Págs: 655-660 ISSN 0959-3993.	30.09.1998
D03	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 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
D04	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 *Beauveria bassiana* (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 tienen los hongos entomopatógenicos, entre ellos *Beauveria bassiana*, de degradar quitosano. Estos hongos durante su ciclo infeccioso secretan proteasas que degradan la cutícula del huésped, y posteriormente secretan quitinasas para degradar la quitina, ya accesible para el hongo, de modo que estos hongos son capaces de utilizar el quitosano y la quitina como única fuente de nutrientes.

El documento D02 divulga el uso del hongo marino *Beauveria bassiana* para la obtención de enzimas quitinolíticas (en concreto, quitinasas) a partir de desechos de la industria del procesado de marisco.

El documento D03 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 D04 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 *Beauveria bassiana* es capaz de utilizar quitosano como única fuente de nutrientes, y que este hongo ya se utiliza para la obtención de enzimas quitinolíticas usando como sustrato desechos de la industria del procesado de marisco. 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 *Beauveria bassiana*, 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).