

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 449**

21 Número de solicitud: 201530552

51 Int. Cl.:

C12P 7/08 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.04.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.10.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.0%)
Ctra S. Vicente del Raspeig s/n
03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ LLORCA, Luis V.;
MARTÍNEZ ARANDA, 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 nematófago Pochonia chlamydosporia**

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 Pochonia chlamydosporia y al uso de dicho hongo para la degradación de residuos marisqueros, obteniendo además biomasa fúngica para su uso agrobiotecnológico.

ES 2 587 449 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE QUITOSANO MEDIANTE EL USO DEL HONGO NEMATÓFAGO *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA*.

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 *Pochonia chlamydosporia*.

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 *Pochonia chlamydosporia*, como organismo productor 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 del hongo *Pochonia chlamydosporia*.

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).

- 20 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de *Pochonia chlamydosporia*, para la producción de etanol a partir de quitosano.

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

- 25 El procedimiento de la presente invención proporcionó las siguientes ventajas:

1. *P. chlamydosporia*, 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
30 de contaminación de los cultivos de *P. chlamydosporia* para la producción de bioetanol, con otros microorganismos.

2. *P. chlamydosporia* 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. *P. chlamydosporia* presenta la capacidad de crecer en condiciones anaeróbicas empleando el quitosano como única fuente de carbono.
4. *P. chlamydosporia*, presenta la capacidad de degradación del quitosano en anaerobiosis, consiguiendo, una degradación de tal compuesto mayor que en condiciones aerobias.
5. *P. chlamydosporia*, presenta la capacidad de tolerar etanol en el medio de cultivo.
6. *P. chlamydosporia*, presenta en su genoma, alcohol deshidrogenasas dependientes de zinc y piruvato descarboxilasas necesarias para la producción de etanol.
7. *P. chlamydosporia*, 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.

15

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra el crecimiento en medio líquido de *P. chlamydosporia* 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 *P. chlamydosporia* 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 *P. chlamydosporia* 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 *P. chlamydosporia* 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 *P. chlamydosporia* 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 *P. chlamydosporia* en medio agar-agua (1.5%) suplementado con alcohol (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 10%).

5 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*
10 *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.

15 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*
20 *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*
25 *thaliana* se han incluido como grupo externo con el fin de enraizar el árbol.

Figura 11: Muestra la producción de etanol por *P. chlamydosporia* 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

30 La presente invención muestra la capacidad que tiene *P.chalamydosporia* 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.

5 **EJEMPLO 1: Crecimiento de *P. chlamydosporia*, en quitosano y degradación de este sustrato como única fuente de nutrientes**

Se analizó la capacidad de crecimiento de *P. chlamydosporia* utilizando quitosano como único nutriente, en medio líquido o sólido. El aislado de *P. chlamydosporia* usado en los modos de realización de la presente invención, fue la cepa 123 (Pc123), procedente de
 10 Sevilla, se obtuvo de huevos infectados del nematodo *Heterodera avenae*, perteneciente a la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada, Universidad de Alicante y depositada en la CECT con el número de referencia 20929. El quitosano empleado, denominado como T8s, fue adquirido a Marine Bioproducts GmbH (Bremerhaven, Alemania). Este quitosano presenta un peso molecular de
 15 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
 20 disuelto y dializado se esteriliza mediante calor húmedo en autoclave antes de su uso.

Las cepas de *P. chlamydosporia*, se cultivaron 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 extrajeron en agua destilada estéril y Tween20 al 0.05%. La suspensión de esporas en
 25 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. Una vez preparadas las diluciones de quitosano, se inocularon con conidios de *P. chlamydosporia* y se cargaron 12 alícuotas de cada tratamiento en una placa multipocillo y se estimó el crecimiento como la absorbancia a
 30 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 *P. chlamydosporia*, fue capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones de quitosano como única fuente de nutrientes. Además, *P. chlamydosporia* presentó un crecimiento muy considerable, proporcionando información acerca de su elevada capacidad degradadora del quitosano y utilización del mismo como única fuente de nutrientes. Además, este hongo no requiere de la adición de PDB (0.025%) para la germinación de sus conidios, por lo que aún presenta una mayor ventaja para su utilización como degradador de tal sustrato (Figura 1).

Pochonia chlamydosporia es un hongo resistente a quitosano, capaz de degradar este compuesto. Los ensayos de crecimiento de *P. chlamydosporia*, 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 *P. chlamydosporia* 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 *P. chlamydosporia*, en anaerobiosis y la degradación de quitosano que fue mayor que la observada en condiciones aerobias..

EJEMPLO 2: Producción de azúcares reductores por parte *P. chlamydosporia*, en presencia de quitosano

Con el objetivo de medir la producción de azúcares reductores por parte de *P. chlamydosporia*, 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 *P. chlamydosporia*, 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 *P. chlamydosporia*, como en el Ejemplo 1, utilizando un sacabocados. El crecimiento de los hongos se midió diariamente y se construyeron curvas de crecimiento (Figura 6). *P. chlamydosporia* es capaz de crecer hasta concentraciones de alcohol de 4%, mostrando un crecimiento radial en medio con etanol.

EJEMPLO 4: Comparación las secuencias de los genes de las Alcohol deshidrogenasas (ADHs) y de las Piruvato descarboxilasas (PDCs) de *P. chlamydosporia*, 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. Con respecto al alineamiento de las alcohol deshidrogenasas (Figura 7), la proteína Pc_10387 posee un alto porcentaje de identidad con secuencias de hongos similares por lo que concluimos se trata del gen ortólogo. Pc_10376 posee un porcentaje de identidad menor de lo esperado con hongos próximos y parece carecer de una región de cerca de 60 aminoácidos en el extremo N-terminal. Por el porcentaje de identidad que posee con las secuencias de levaduras y otros hongos, resulta probable que se trate de un gen duplicado y que posea la misma actividad enzimática. No obstante, no puede descartarse algún grado de subfuncionalización similar al observado en *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida albicans*. El alineamiento de las secuencias de la piruvato carboxilasa se presentan en la Fig. 9. La secuencia posee un alto porcentaje de identidad con hongos próximos, formando un clado monofilético con las secuencias de *Metarhizium anisopliae* y *Claviceps purpurea*. Sorprende, no obstante, la posición de las secuencias de *Beauveria bassiana* y *Cordyceps militaris*. La proteína posee un alto grado de conservación general, si bien existen al menos tres regiones variables en de su secuencia.

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). Pc_10376 está anotada como alcohol deshidrogenasa I, ortólogo de la alcohol deshidrogenasa (ADH) implicada en la producción de etanol en levadura. Pc_10367 posee un porcentaje de identidad similar con la levadura, pero relativamente bajo con ADHs de hongos filamentosos próximos a *P. chlamydosporia*. Pc_10376 aparece en nuestro árbol filogenético como grupo hermano de la ADH1 canónica de *Metarhizium anisopliae*, formando un clado hermano al ortólogo de *Trichoderma reesei*. Pc_10367, en cambio, aparece como grupo hermano de la ADH de *Aspergillus terreus*. Si bien los resultados son incongruentes con la taxonomía establecida de estos grupos, las distancias filogenéticas y los soportes de bootstrap indican que ADH no es un buen marcador para resolver la filogenia de estos grupos, y debemos considerar que las secuencias no difieren lo suficiente como para resolver adecuadamente las relaciones filogenéticas. En vista de estos resultados, concluimos que Pc_10367 es fruto de una duplicación génica con posterior subfuncionalización (parálogo) o de un evento de transferencia horizontal (xenólogo). Sería necesario abordar estudios evolutivos más exhaustivos para descartar o apoyar cualquiera de las dos hipótesis. Como

este gen, no está presente en otros hongos parásitos de ecdisozoos próximos, consideramos que *Pochonia chlamydosporia* posee recursos “extra” para la producción de etanol. Varios genes del genoma de *P. chlamydosporia* están anotados como piruvato decarboxilasa, pero debido a que se realizó la búsqueda por homología, sólo se eligió el gen Pc_2054 para la construcción del árbol (Figura 10).

EJEMPLO 5: Producción de etanol por parte de *P. chlamydosporia*, en presencia de quitosano.

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 alícuotas de 10 ml de los cultivos aerobios de 5 días de *P. chlamydosporia*, 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..

REIVINDICACIONES

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

15

FIG. 1

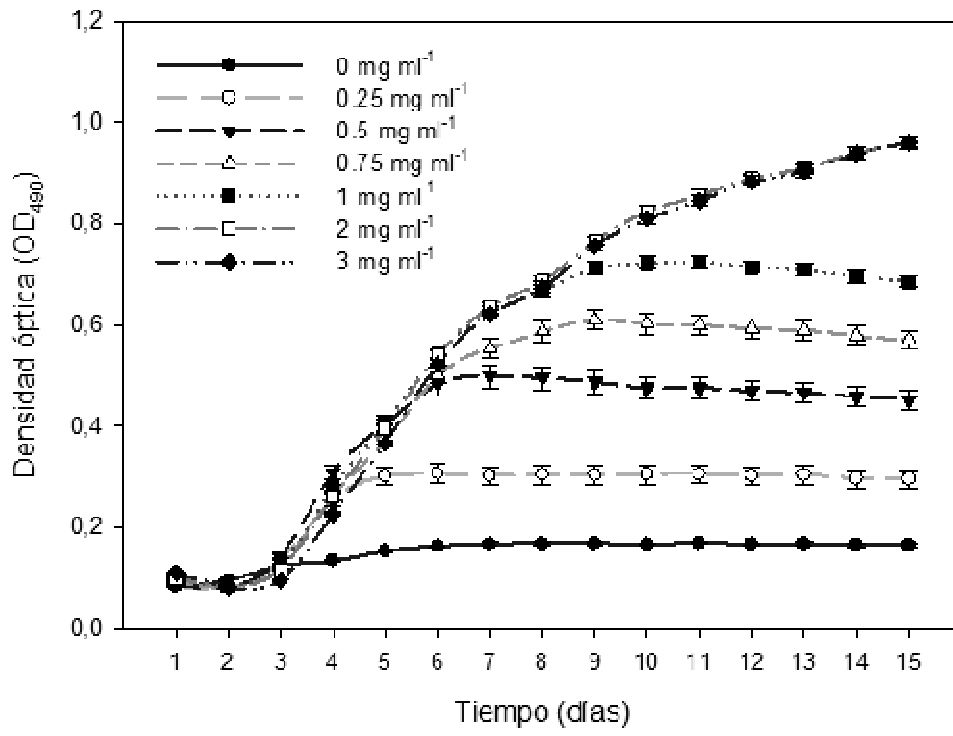


FIG. 2

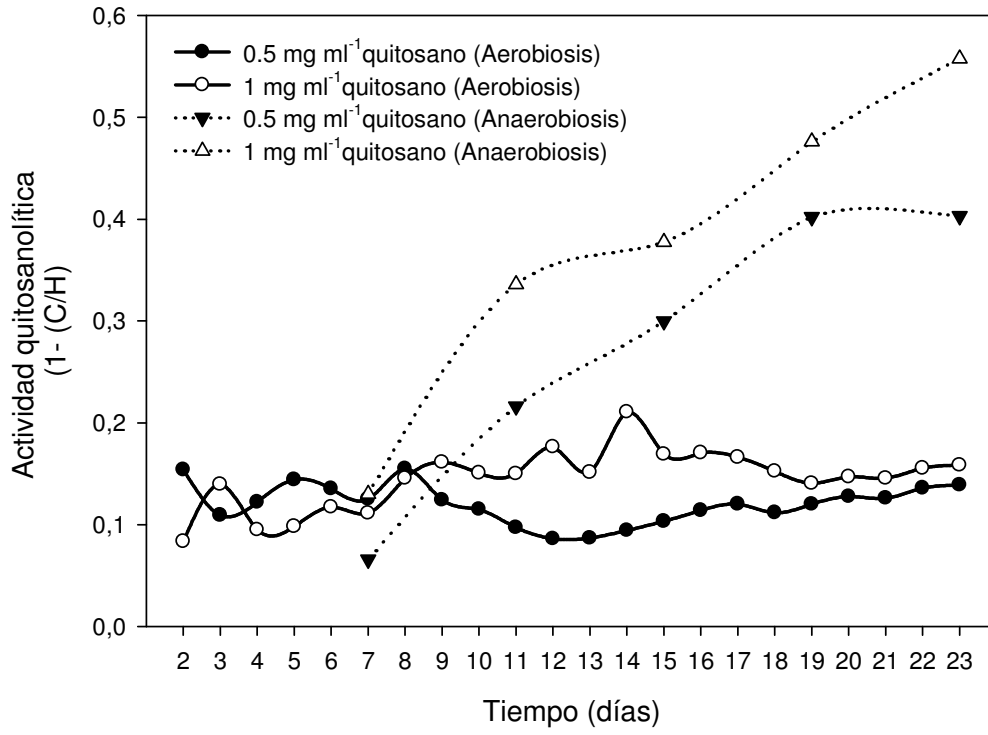


FIG. 3

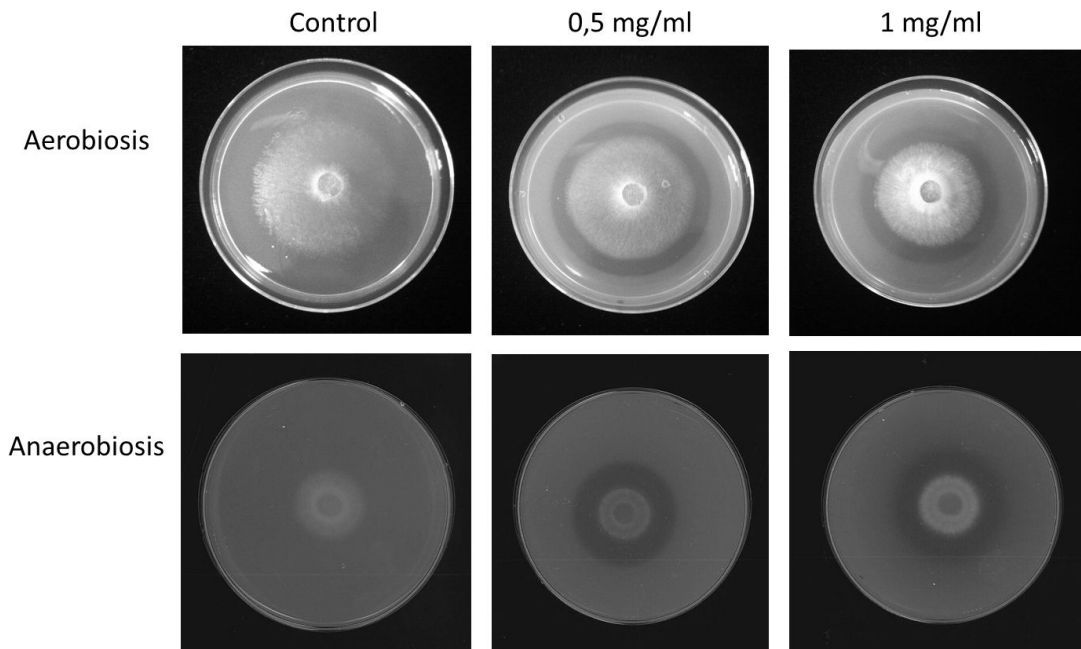


FIG. 4

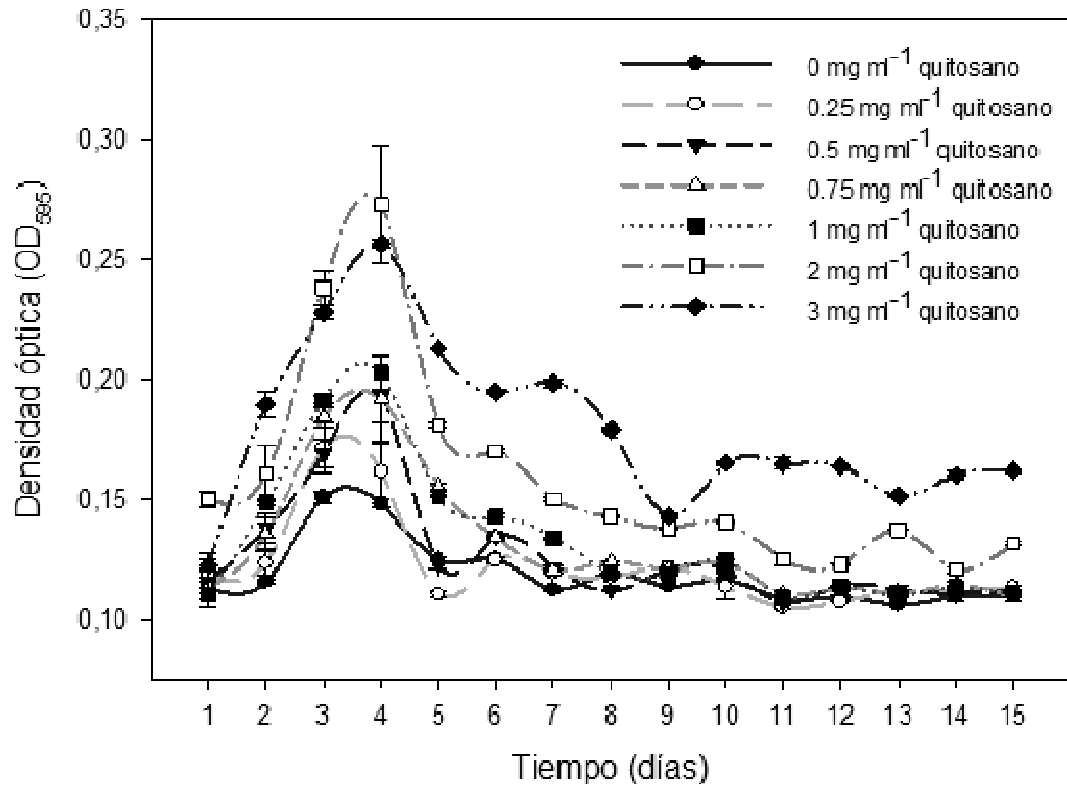


FIG. 5

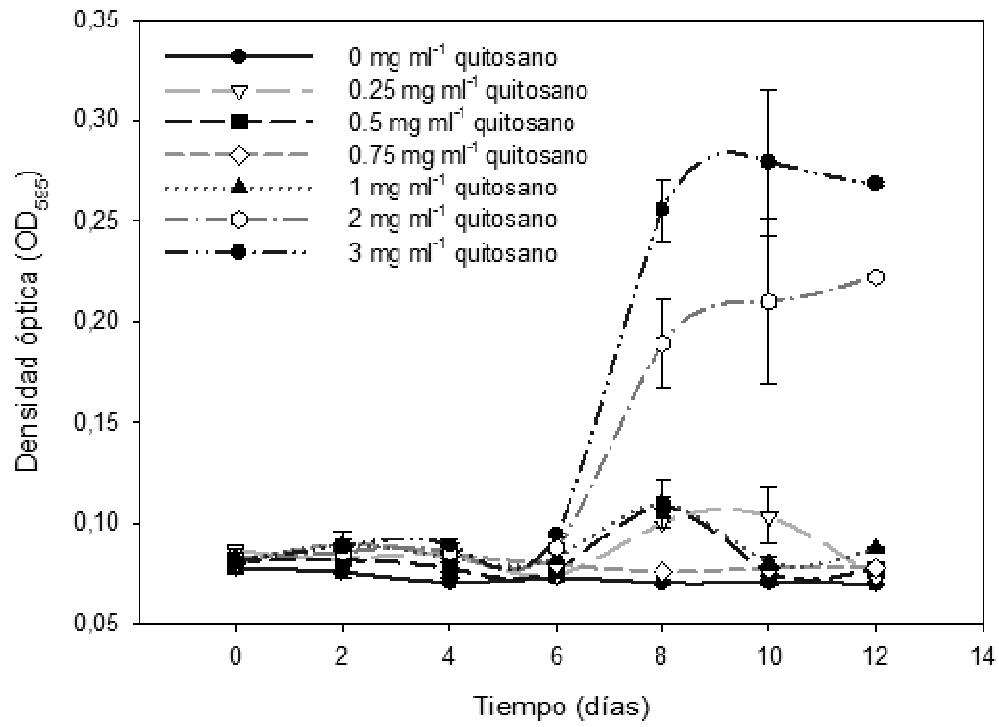


FIG. 6

A

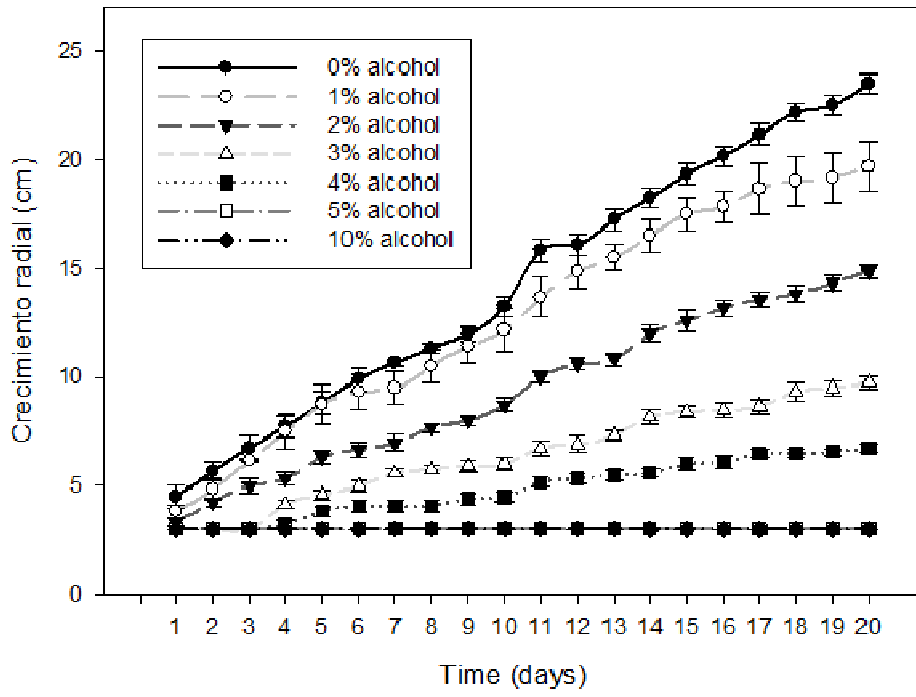
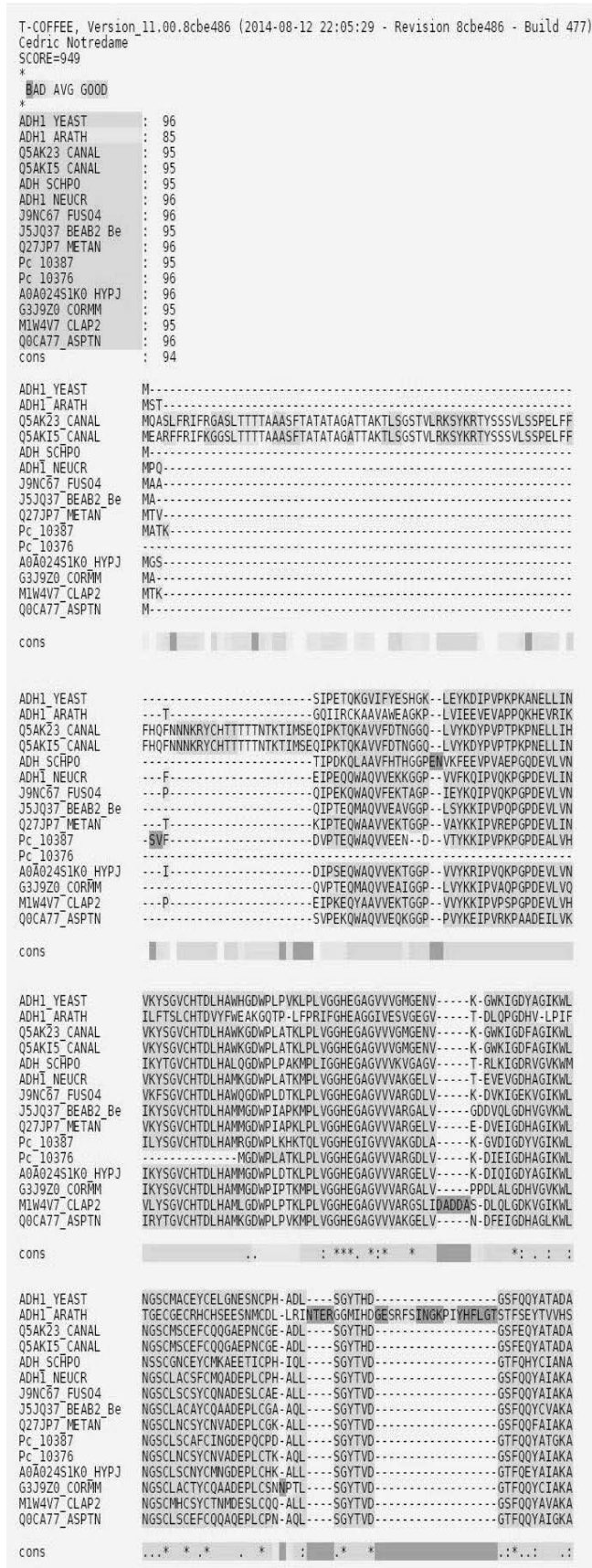


FIG 7



ADH1_YEAST VQAHTPOGTDLAQVAPILCAGITVYK--ALKSANLMAGHWVAISGAAGGLGSLAVQYAKAMG
 ADH1_ARATH GQVAKINPDAPLDKVCIVSCG-LSTGLGATLNVAKPKKGGQSVAFGLGA-VLGAEGGARIAG
 Q5AK23_CANAL VQAAKIPAGTDLANVAPILCAGITVYK--ALKTADLAAGOWVAISGAGGGLGSLAVQYARAMG
 Q5AK15_CANAL VQAAKIPAGTDLANVAPILCAGITVYK--ALKTADLAAGOWVAISGAGGGLGSLAVQYARAMG
 ADH_SCHPO THATIIPESVPLEVAAPIMCAGITCYR--ALKESKVGPGEWICIPGAGGGLGHLAVQYAKAMA
 ADH1_NEUCR AHVAKIPKGCDELLETTAPVLCAGITVYK--GLKESGVRPGQCVAVIVGAGGGLGSMAIQYANAMG
 J9NC67_FUS04 IHVARIPKECDLESISPLCAGITVYK--GLKESGVKAGQSIIVGAGGGLGSLAVQYCKAMG
 J5JQ37_BEAB2_Be AHVARIPKCDLEAIAPLLCAGITVYK--GLKESGARAGQSVVAVGAGGGLGSLACQYARAMG
 Q27J37_METAN AHVARIPKCDLEAIAPLLCAGITVYK--GLKESGAQPGQSVAVIVGAGGGLGSLACQYAKAMG
 Pc_10387 MHLTQIPKDCDLAAAPILCAGLTVYK--GLKESGARPAQFVAVIVGAGGGLGSLAIQYAKAMG
 Pc_10376 AHVARIPKCDLEAIAPLLCAGITVYK--GLKESGAKAGESVAIVGAGGGLGSLACQYAKAMG
 A0A02451K0_HYPJ AHVARIPKCDLESVAPILCAGITVYK--GLKESLARPQGTIAVIVGAGGGLGSLALQYAKAMG
 G3J9Z0_CORMM AHVARIPKCDLEAVAPILCAGITVYK--GLKESGAKAGQSVVAVGAGGGLGSLACQYARAMG
 M1W4V7_CLAP2 AHVARIPADCDLEAVAPILCAGLTVYK--GLKESGARAGQTVAVIVGAGGGLGCFAIQYAKAMG
 Q0CA77_ASPTN ALASKIPKNVPLDAVAPILCAGLTVYK--GLKESGARPQGTVAIVGAGGGLGSLALQYAKAMG

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

ADH1_YEAST -YRVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVDFIDFTKE-KDIVGAVLKATD-G-GAHGVINVSVEAAIE
 ADH1_ARATH #SRIIGVDFNSKRFDAQEFGVTECVNPKDH-DKPIQQVIAEMTDG-GVDRSVECTGQVQAMI
 Q5AK23_CANAL -LRVVAIDGGDEKGEFVKSLGAEAYVDFTKD-KDIVEAVKKATD-G-GPHGAINVSVEKAID
 Q5AK15_CANAL -LRVVAIDGGDEKGEFVKSLGAEAYVDFTKD-KDIVEAVKKATD-G-GPHGAINVSVEKAID
 ADH_SCHPO -MRVVAIDTGDQKAEKVSFGAEVFLDFKKE-ADMIEAVKAATN-G-GAHGTLVLTSPKSYE
 ADH1_NEUCR -LHAIADIDGGEEKGNKRELGAQAYVDFTTT-KDLVADVKAATPDGLGPHAVLLVAVEKPFH
 J9NC67_FUS04 -IHAIADIDGGEEKGKTKELGATAYVDFTTT-KNLVADVKAATSDGLGPHAAALLVATNEKPFQ
 J5JQ37_BEAB2_Be -LRVIGIDTGDKEKRALVQSYGAD-FVDFRFS-KDIVSETRALTPDGLGAHAALLLAVQEGPFQ
 Q27J37_METAN -LNIIAIDAGDEKRDMLKLGADVFVDFMFS-TDLVAEVKAASADGLGPHAVLLVAVTEKPFQ
 Pc_10387 -LRTIAVDAGEAKGKFCSTLGADAYVDFTKS-NDLVKDIKAATDGLGPHAAALLVAAKEKPFH
 Pc_10376 -FKIIAIDAGAEEKDMCMKLGADTFVDFTTT-KDLVSEVKAASNDGQGPAAVLLVAVTEKPFQ
 A0A02451K0_HYPJ -LRSIAIDAGDEKRDMLKLGASAFVDFMFS-KDLVADVKAATPDGEGPHAAALLVAAKEKPFQ
 G3J9Z0_CORMM -LRVIGVDTGADKQALVQSYGCD-FVDFMFS-KDLVADVKAATPDGGLGAHAALLVAAKEKPFQ
 M1W4V7_CLAP2 -LHVVAIDGGAEKRLCLELGAASYVDFMESGSLVEDVKRASVDGLGPHAVLLVAANEKPFQ
 Q0CA77_ASPTN -LRAVAIDGGEEKRQMCQSLGAEAYVDFFAAS-QNVVVDVKAATPDGGLGAHAALLVAANEKPFQ

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

ADH1_YEAST ASTRYVR-ANGTTVLVGMVAGAKCCSDVFNQVVKISIVGSGYVGNRADTRE---ALDFFAR--
 ADH1_ARATH QAFECVH#GQWVAVLVGVPKDDAFKTHPMNFLNERTLKGTFGNYKPRDTPGVVEKYMNKE
 Q5AK23_CANAL QSVEYVR-PLGKVVLVGLPAHAKVTAPVFDVAVVKSIEIKGSYVGNRKTAE---AIDFFSR--
 Q5AK15_CANAL QSVEYVR-PLGKVVLVGLPAHAKVTAPVFDVAVVKSIEIKGSYVGNRKTAE---AIDFFSR--
 ADH_SCHPO QAAGFAR-PGSTMVTVSMPAGAKLGADIFMLTVKMLKICGSHVGNRIDSIE---ALEYVSR--
 ADH1_NEUCR QAQDYVR-SRGTIICIGLPAAGAKFQAPVFDVIRMIITIKGSYVGNRQDTQE---ALDFFAR--
 J9NC67_FUS04 QATQYIR-SRGTVVICIGLPAQAQFAPVFDVVRMISIKGSYVGNRADTAE---AIDFFRR--
 J5JQ37_BEAB2_Be QATQYVR-SRGVVVICIGLPAADAHFAPVFDVLRMIQIRGSYVGNRRTAE---AIEFYRK--
 Q27J37_METAN QATQYVR-SRGVVVICIGLPAANAKSAPVFDVIRMINIKGSYVGNRADTAE---AIEFYRR--
 Pc_10387 QATEYVR-PRGTVVCGVMPKEAQIKASVFDVVRMLSIKGSYVGNRADANE---AVEIFRA--
 Pc_10376 QATQYVR-SRGVVVICIGLPAADAKSAPVFDVIRMINIKGSYVGNRADTAE---AIEFYRR--
 A0A02451K0_HYPJ QATEYLR-SKGVLCIGLPAAGARLSAPVFDVIRMIITIKGSYVGNRADTQE---ALDFFRR--
 G3J9Z0_CORMM QATQYVR-SRGVVVICIGLPAADAHFAPVFDVLRMIQIRGSYVGNRLDSAE---AIEFFRL--
 M1W4V7_CLAP2 QATQYVR-AHGTVVICIGLPAANAFSAPVFDVVRMISIKGSYVGNRADTAE---ALDFFAR--
 Q0CA77_ASPTN QAADYVR-SRGTIVAIGLPAANAFKAPVFNVTVRMINIKGSYVGNRQDQVE---AIDFFAR--

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

ADH1_YEAST -GLVKSPKIVVGLSTLPEIYKMEKQIVGRYVVDTSK
 ADH1_ARATH #LEKFIHTVPPFSEINKAFDYMLKGESI-RCIITMGA
 Q5AK23_CANAL -GLIKCPTIKIVGLSDLPEVFKLMEEGKILSRVLDTS
 Q5AK15_CANAL -GLIKCPTIKIVGLSDLPEVFKLMEEGKILGRVLDTSK
 ADH_SCHPO -GLVKPYKVPFSTLPDVYRLMHNKIAGRIVLDLSK
 ADH1_NEUCR -GLIKVPTKTIVGLSKLQEVYDLMEEGKIVGRYVVDTSK
 J9NC67_FUS04 -GLIKVPTKTIVGLSELNEVYKLMKAGQIVGRYVVDTSR
 J5JQ37_BEAB2_Be -GLVKVPYKVVGLSELPAVYDLMKAGQITGRVLDTSR
 Q27J37_METAN -GLINAPFKTVGLSQLQDVYELMKEGKIAGRYVVDTSK
 Pc_10387 -GLVKAPVTVVPLSKLSEVFDAMASGDIIGRYVLDTSK
 Pc_10376 -GLINAPFKTVGLSQLQDVYKLMKEGKIAGRYVVDTSK
 A0A02451K0_HYPJ -GLITVPTKTVGLSQLQDIYTLMEAKIAGRYVVDPTR
 G3J9Z0_CORMM -GLIKVPTKTIVGLSELPTVYDLMRAGKITGRVLDMSR
 M1W4V7_CLAP2 -GLIKVPTKTIVGLSELQDVYKLMSEKGIAGRYVVDTSK
 Q0CA77_ASPTN -GLIKAPFKVAPLKDLPKIFELMEQGIAGRYVLDVPQ

cons * . : : : * . * : :

FIG. 8

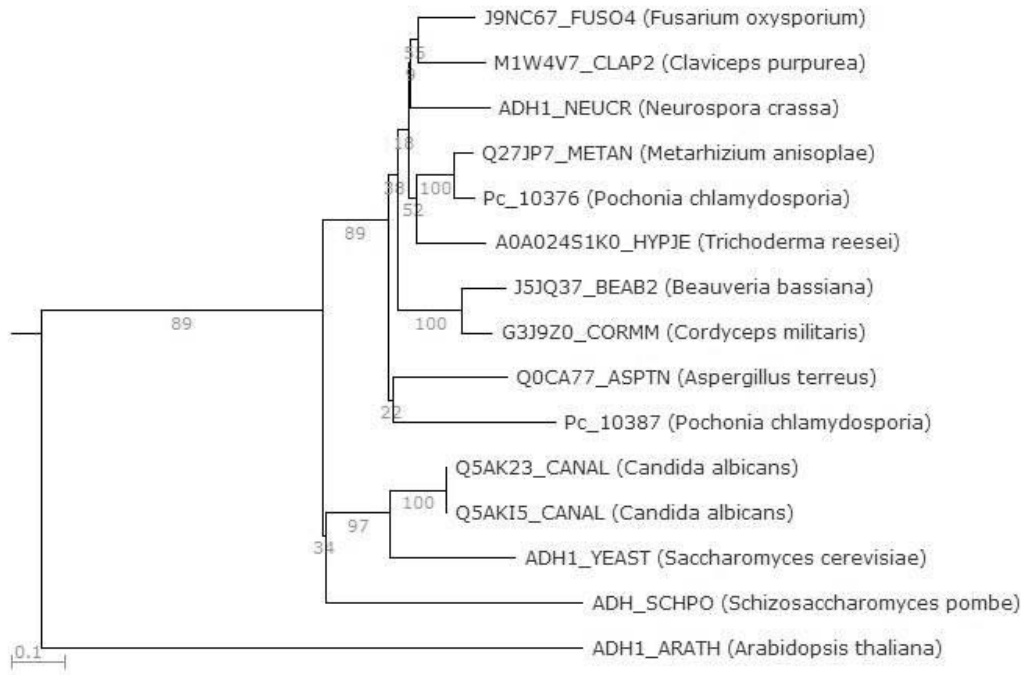


FIG. 10

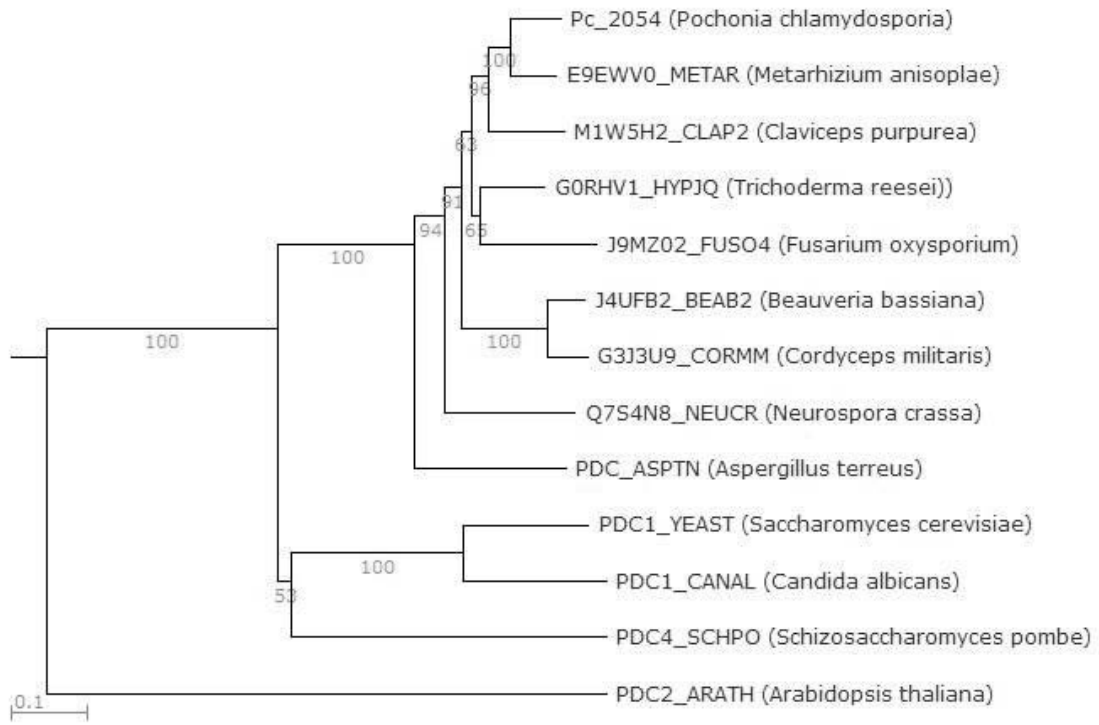
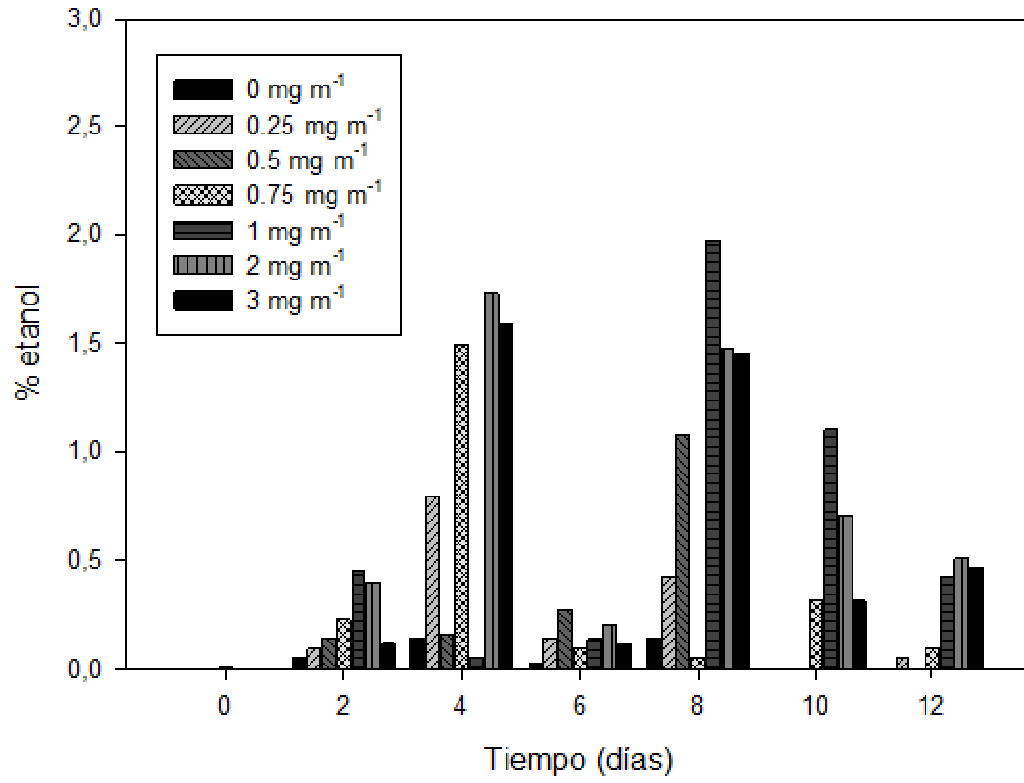


FIG. 11

A





- ②① N.º solicitud: 201530552
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	PALMA-GUERRERO J et al. "Comparative analysis of extracellular proteins from <i>Pochonia chlamydosporia</i> grown with chitosan or chitin as main carbon and nitrogen sources." ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 20100607 STONEHAM, MA, US 07.06.2010 VOL: 46 No: 7 Págs: 568-574 ISSN 0141-0229; 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
13.06.2016

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, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.06.2016

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	PALMA-GUERRERO J et al. "Comparative analysis of extracellular proteins from <i>Pochonia chlamydosporia</i> grown with chitosan or chitin as main carbon and nitrogen sources." ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 20100607 STONEHAM, MA, US 07.06.2010 VOL: 46 No: 7 Págs: 568-574 ISSN 0141-0229.	07.06.2010
D02	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.	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 *Pochonia chlamydosporia* (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 *Pochonia chlamydosporia* de degradar quitosano. Este hongo es capaz de crecer en medios ricos en quitosano, el cual, induce la expresión de determinadas proteínas con actividad quitosanólíticas, de modo que este hongo es capaz de utilizar el quitosano 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.

Del estado de la técnica citado ya es conocido que el hongo *Pochonia chlamydosporia* (tb denominado *Verticillium chlamydosporium*) es capaz de utilizar quitosano 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 *Pochonia chlamydosporia*, 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).