



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.10.31

(21) Номер заявки
201101213

(22) Дата подачи заявки
2010.02.16

(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ УФ-УСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 09305154.8; 61/153,478

(32) 2009.02.17; 2009.02.18

(33) EP; US

(43) 2012.03.30

(86) PCT/EP2010/051885

(87) WO 2010/094665 2010.08.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЕИНОВ; САНТР НАСЪОНАЛЬ ДЕ
ЛЯ РЕШЕРШ СЪЕНТИФИК (FR)

(72) Изобретатель:
Изоп Кати, Жозеф Паскаль, Леонетти
Жан-Поль, Битон Жак (FR)

(74) Представитель:
Саломатина И.С. (RU)

(56) HARISH V. ET AL.: "Xylanase production by ultra violet induced variants of *Streptomyces fradiae* SCF-5". JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, INDIA, DISCIPLINE OF MICROBIOL., FERMENTATION & SANITATION, CENT. FOOD TECH. RES. INST, vol. 15, no. 6, 1 January 1978 (1978-01-01), pages 243-246, XP008107940, ISSN: 0022-1155, the whole document

ALEA F. ET AL.: "SELECTION OF HYPERCELLULOLYTIC DEREPPRESSED MUTANTS OF *CELLULOMONAS*-SP". APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 35, no. 5, 1991, pages 643-645, XP002534883, ISSN: 0175-7598, the whole document

TEMP ULRIKE ET AL.: "A small-scale method for screening of lignin-degrading microorganisms". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 1548-1549, XP002581465, ISSN: 0099-2240, the whole document

VERONICA FERNANDEZ ZENOFF ET AL.: "Diverse UV-B Resistance of Culturable Bacterial Community from High-Altitude Wetland Water". CURRENT MICROBIOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 52, no. 5, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 359-362, XP019365726, ISSN: 1432-0991, the whole document

WEON HANG-YEON ET AL.: "*Deinococcus cellulosityticus* sp nov., isolated from air". INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 57, no. Part 8, August 2007 (2007-08), pages 1685-1688, XP002534882, ISSN: 1466-5026, cited in the application, the whole document

PAVLIKOVA E. ET AL.: "IMPROVEMENT OF THE BASIDIOMYCETE *COPRINUS*-SP". FOLIA MICROBIOLOGICA, PRAQUE, CZ LNKD-DOI:10.1007/BF02879771, vol. 27, no. 2, 1 January 1982 (1982-01-01), pages 126-130, XP008107939, ISSN: 0015-5632, the whole document

WO-A1-2009063079

WO-A1-1997010352

VIJAYA HARISH et al., Xylanase production by ultra violet induced variants of *Streptomyces fradiae* SCF-5, Journal of Food Science and Technology, 1978, vol. 15, No. 6, pp. 243-246

ZENOFF V.F. et al., Diverse UV-B resistance of culturable bacterial community from high-altitude wetland water, Current Microbiology, 2006, vol. 52, No. 5, pp. 359-362, pdfepar

WEON H.Y. et al., *Deinococcus cellulosityticus* sp. nov., isolated from air, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57, pp. 1685-1688

FERRIERA A.C. et al., *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs, International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, vol. 47, № 4, pp. 939-947

ALEA F. et al., Selection of hypercellulolytic derepressed mutants of *Cellulomonas* sp., Appl Microbiol Biotechnol, 1991, vol. 35, no. 5, pp. 643-645

(57) Настоящее изобретение раскрывает способ отбора или выделения УФ-устойчивых бактерий, обладающих способностью расти в присутствии лигнина, целлюлозы и/или ксилана в качестве единственного источника углерода, бактерии, полученные этим способом, и их применение для гидролиза лигноцеллюлозной биомассы с целью получения биотоплива или органических кислот.

Настоящее изобретение касается композиции и способов производства биоэнергетических продуктов и метаболитов, представляющих интерес для промышленности, из лигноцеллюлозной биомассы. Более конкретно, настоящее изобретение описывает идентификацию, характеризацию и выделение новых бактерий, обладающих значительной способностью превращать лигноцеллюлозную биомассу в сбраживаемые сахара и, что даже более существенно, в биоэнергетические продукты и метаболиты. Настоящее изобретение также раскрывает способ выделения бактерий, композиции, включающие такие бактерии, и их применение для модификации лигноцеллюлозной биомассы с целью производства биоэнергии.

Уровень техники

Превращение лигноцеллюлозной биомассы является предметом интенсивных исследований, начиная с 1970 годов (Blumer-Schuette et al., 2008, *Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects*, *Curr Opin Biotechnol* 19, pp. 210-217; Perez et al., 2002, *Int. Microbiol* 5, pp. 53-63).

В этой связи известно использование микроорганизмов для модификации трансформированной биомассы, преимущественно предварительно обработанного сельскохозяйственного сырья, для производства биоэнергетических продуктов, таких как этанол. Однако, как сообщали Mosier et al. (*Bioresource Technology* 96 (2005), 673-686), для изменения структуры целлюлозной биомассы требуется предварительная обработка лигноцеллюлозной биомассы для того, чтобы сделать целлюлозу более доступной для ферментов, которые превращают углеводные полимеры в сбраживаемые сахара.

Однако можно надеяться, что в будущем виды биотоплива или биоэнергетические продукты будут производиться из сырой лигноцеллюлозной биомассы, а не из предварительно обработанного сельскохозяйственного сырья. Использование такой сырой биомассы будет требовать наличия эффективного способа деградации (например, гидролиза) лигноцеллюлозной биомассы в сбраживаемые сахара, которые после этого могут быть превращены в процессе сбраживания в биоэнергетические продукты (например, спирты и другие метаболиты, имеющие промышленное значение). Таким образом, получение сбраживаемых сахаров (например, мономерных сахаров) из сырой лигноцеллюлозной биомассы является основной задачей, для решения которой предлагаются различные подходы, такие как термохимические методы, кислотный гидролиз и ферментативный гидролиз.

Однако в связи с тем, что состав лигноцеллюлозной биомассы варьирует в широких пределах, и каждая биомасса различается по специфическому содержанию целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, разработка ферментов или ферментных композиций для гидролиза такой сырой биомассы, вероятно, не является экономически оправданной. Кроме того, лигниновые побочные продукты, остающиеся после такой переработки лигноцеллюлозной биомассы, как правило, остаются не модифицированными и теряются.

WO 2009/063079 описывает применение бактерий рода *Deinococcus* для производства биоэнергетических продуктов и метаболитов в процессе ферментации биомассы.

Tarun et al. (ABV 45 (1994), 209) сообщают о способности бактерий рода *Clostridium* расщеплять сбраживаемые сахара.

WO 97/10352 касается бактериальных штаммов *Pseudomonas*, которые расщепляют целлюлозу. Аналогично этому, Weon et al. (*Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology* (2007), 57, pp. 1685-1688) сообщают об устойчивых к ультрафиолету штаммах *Deinococcus*, которые гидролизуют целлюлозу.

W. Zimmermann (*Journal of Biotechnology*, 13 (1990), 119-130) предоставляет обзор бактериальной деградации лигнина.

Однако в настоящее время не было сообщений о бактериях, обладающих способностью гидролизовать основные компоненты лигноцеллюлозной биомассы, включая лигнин, ксилан и целлюлозу, в условиях, пригодных для промышленного производства. В частности, никогда не были выделены бактерии, которые могут расщеплять лигнин в условиях промышленного процесса.

Таким образом, существует потребность в экономически эффективном и масштабируемом способе расщепления лигноцеллюлозной биомассы до полезных продуктов, таких как сбраживаемые сахара или биоэнергетические продукты и метаболиты.

Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение касается композиций и способов получения полезных продуктов из лигноцеллюлозной биомассы или её производных. Более конкретно, настоящее изобретение касается новых бактерий, обладающих способностью превращать лигноцеллюлозную биомассу или её производные в полезные продукты, включая сбраживаемые сахара и биоэнергетические продукты. Настоящее изобретение также касается способов производства полезных продуктов и метаболитов с применением таких бактерий.

Настоящее изобретение среди прочего берет свое начало с идентификации микроорганизмов, обладающих неожиданными и выдающимися свойствами по превращению лигноцеллюлозной биомассы или её производных с точки зрения получения соединений, которые могут использоваться для производства биоэнергии, в частности этанола, в промышленном масштабе, а также экономически эффективно и надежно.

В этой связи настоящее изобретение основывается на разработке улучшенного способа отбора или

идентификации бактерий из любого образца. Более конкретно, настоящее изобретение раскрывает способ отбора, или идентификации, или выделения бактерий, включающий следующие стадии:

- а) взятие образца, включающего бактерии;
- б) обработка образца для разрушения клеток и повреждения ДНК; и
- с) отбор или выделение из указанного обработанного образца бактерий, которые обладают способностью жить или расти в присутствии лигнина, целлюлозы или ксилана в качестве источника углерода, например, используют лигнин, целлюлозу или ксилан в качестве источника углерода.

Дополнительной целью настоящего изобретения являются бактерии, полученные таким способом, или экстракт указанных бактерий.

С помощью способа по изобретению авторы настоящего изобретения действительно выделили и идентифицировали из сырых материалов новые микроорганизмы, обладающие неожиданной способностью гидролизовать три основных компонента лигноцеллюлозной биомассы, а именно целлюлозу, ксилан и лигнин.

Открытие того, что микроорганизмы способны трансформировать содержащий лигнин сырой материал для производства биоэнергетических продуктов, представляет собой технологический прорыв, поскольку обеспечивает одностадийный процесс производства биоэнергетических продуктов (например, этанола) из сырой биомассы (лигноцеллюлозной биомассы) и преодолевает существующие недостатки, связанные с использованием предварительно обработанного сельскохозяйственного сырья вместо лигноцеллюлозной сырой биомассы. Более того, те же самые бактерии настоящего изобретения могут применяться в ходе всего производственного процесса, то есть для гидролиза лигноцеллюлозной биомассы и для получения биоэнергетических продуктов путем сбраживания в ходе одновременного процесса осахаривания и сбраживания (*simultaneous saccharification and fermentation, SSF*).

Таким образом, цель настоящего изобретения заключается в изолированных бактериях, которые обладают способностью расти в присутствии лигнина, или целлюлозы, или ксилана в качестве источника углерода при температуре 30°C или выше и является устойчивой к обработке УФ при интенсивности 4 мДж/см².

Конкретная цель настоящего изобретения представляет собой изолированные бактерии, которые обладают способностью расти в присутствии лигнина в качестве единственного источника углерода при температуре 30°C или выше и являются устойчивыми к обработке УФ при интенсивности 4 мДж/см².

Другая конкретная цель настоящего изобретения представляет собой изолированные бактерии, которые обладают способностью использовать целлюлозу и ксилан в качестве источника углерода при температуре 30°C или выше и являются устойчивыми к обработке УФ при интенсивности 4 мДж/см².

В предпочтительном воплощении бактерии настоящего изобретения обладают выдающейся способностью использовать лигнин, целлюлозу и ксилан в качестве источника углерода. Настоящее изобретение действительно демонстрирует, что бактерии, обладающие способностью разлагать все главные компоненты лигноцеллюлозной биомассы, могут быть идентифицированы и могут культивироваться. Такие бактерии могут применяться для превращения такой биомассы с беспрецедентной эффективностью.

В конкретном и предпочтительном воплощении бактерии настоящего изобретения могут выращиваться или культивироваться как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Настоящее изобретение действительно неожиданно демонстрирует, что с бактериями настоящего изобретения можно работать в условиях, таких как анаэробные условия, пригодных для получения больших количеств биоэнергетических продуктов или метаболитов из различных субстратов.

В конкретном воплощении бактерии настоящего изобретения содержат экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты.

Бактерии настоящего изобретения принадлежат в предпочтительном воплощении к родам, выбираемым из *Deinococcus*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Methylobacterium*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Caldimonas*, *Paenibacillus*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingobium*, *Sphingopyxis* или *Porphyrobacter*.

Как показано в примерах, бактерии из указанных выше родов, которые могут быть идентифицированы и могут культивироваться, способны превращать биомассу и быть устойчивыми к разрушающей клетки обработке УФ мощностью 4 мДж/см². Эти бактерии демонстрируют выдающиеся способности по превращению биомассы, включая лигноцеллюлозную биомассу, в высоко полезные продукты.

Дополнительной целью настоящего изобретения является композиция, включающая бактерии настоящего изобретения и культуральную среду.

Дополнительной целью настоящего изобретения является экстракт из бактерий, как указано выше.

Дополнительная цель настоящего изобретения заключается в применении бактерий настоящего изобретения или экстракта из этих бактерий для гидролиза лигноцеллюлозной биомассы или для превращения или перевода лигноцеллюлозной биомассы в сбраживаемые сахара.

Дополнительная цель настоящего изобретения представляет собой способ деградации или превращения лигноцеллюлозной биомассы в сбраживаемые сахара, включающий стадию обработки лигноцеллюлозной биомассы бактериями настоящего изобретения или экстрактом этих бактерий.

Дополнительная цель настоящего изобретения представляет собой способ производства сбраживаемых сахаров из лигноцеллюлозной биомассы, включающий стадию обработки лигноцеллюлозной биомассы бактериями настоящего изобретения или экстрактом этих бактерий.

Указанные выше способы могут применяться в аэробных и/или анаэробных условиях, при повышенных температурах (например, по меньшей мере 30°C или выше) и обеспечивают эффективное превращение всех главных типов компонентов лигноцеллюлозной биомассы. Более того, в конкретном воплощении способы настоящего изобретения включают дополнительную стадию либо сбора сбраживаемых сахаров, либо превращения сбраживаемых сахаров в биоэнергетические продукты или метаболиты. Такая стадия превращения (сбраживания) может проводиться с применением бактерий настоящего изобретения или других бактерий, или комбинации бактерий или их экстрактов.

В предпочтительном воплощении как гидролиз, так и сбраживание проводятся с применением бактерий настоящего изобретения, более предпочтительно одних и тех же бактерий. Действительно, в предпочтительном воплощении настоящее изобретение обеспечивает получение биоэнергетических продуктов непосредственно из лигноцеллюлозной биомассы, обеспечивая как гидролиз лигноцеллюлозной биомассы, так и сбраживание сахаров.

Таким образом, дополнительная цель настоящего изобретения заключается в применении бактерий настоящего изобретения для производства биоэнергетических продуктов или метаболитов.

Другая цель настоящего изобретения представляет собой способ получения биоэнергетического продукта или метаболита, включающий стадию обработки лигноцеллюлозной биомассы бактериями настоящего изобретения или экстрактом из них и извлечение полученного биоэнергетического продукта или метаболита.

В предпочтительном воплощении как гидролиз, так и сбраживание проводятся с применением бактерий настоящего изобретения, наиболее предпочтительно одних и тех же бактерий. Необходимо отметить, что в альтернативном воплощении могут применяться две или более разных бактерий, последовательно или в комбинации, для получения биоэнергетических продуктов из лигноцеллюлозной биомассы.

В конкретном аспекте настоящее изобретение касается способа, включающего следующие стадии:

получение (или культивирование и/или выращивание) бактерий настоящего изобретения или экстракта из них;

превращение лигноцеллюлозной биомассы или её производного в биоэнергетические продукты или метаболиты, имеющие промышленную ценность (например, биоэнергетические ресурсы, такие как этанол, химические строительные блоки, такие как янтарная кислота) с применением указанных бактерий или экстракта из них, и

сбор по меньшей мере одного биоэнергетического продукта или метаболита, полученного в ходе указанного превращения.

Настоящее изобретение также касается композиции, включающей бактерии, как определено выше, и лигноцеллюлозную биомассу или их производное.

Настоящее изобретение также касается биоэнергетических продуктов или метаболитов с применением способа, как описано выше.

Дополнительная цель настоящего изобретения представляет собой реактор или ферментер, включающий лигноцеллюлозную биомассу и бактерии настоящего изобретения.

Подписи к фигурам

Фиг. 1. Результаты роста устойчивых к УФ термофильных бактерий на среде ММ+СМС 1% в анаэробных условиях.

Фиг. 2. Результаты роста устойчивых к УФ термофильных бактерий на среде ММ+ксилан 1% в анаэробных условиях.

Фиг. 3. Результаты роста устойчивых к УФ розовых изолятов на среде ММ+лигнин 0,1% в аэробных условиях при 30°C в течение 5 дней. Обведены изоляты М10-1D и М10-1E, которые способны использовать лигнин в качестве единственного источника углерода, и М10-8D, который способен разрушать лигнин.

Фиг. 4. Штамм *Deinococcus DRH46* способен разрушать бумажный журнал.

Осуществление изобретения

Настоящее изобретение описывает идентификацию, характеристику и выделение новых бактерий, обладающих выдающейся способностью превращать лигноцеллюлозную биомассу в сбраживаемые сахара и, что даже более замечательно, в биоэнергетические продукты и метаболиты. Настоящее изобретение также раскрывает способ выделения таких бактерий, композиций, включающих такие бактерии, и их применение для модификации лигноцеллюлозной биомассы с точки зрения получения биоэнергетических продуктов и метаболитов.

Определения

Термин "лигноцеллюлозная биомасса" согласно настоящему изобретению обозначает сырую биомассу, содержащую лигнин, целлюлозу и/или ксилан. Таким образом, термин "лигноцеллюлозная биомасса", по существу, обозначает необработанный материал биологического происхождения, такой как продукты лесозаготовок, включая зрелые деревья, непригодные для производства пиломатериалов или

бумаги, сельскохозяйственные продукты, такие как трава, солома, и навоз животных, и водные продукты, такие как водоросли и морская трава. Специфические источники биомассы включают, но ими не ограничиваются, древесину твердых и мягких пород, кукурузные початки (сердцевину), солому злаков, траву, листья, семена, бумагу и т.д. (см., например, Sun et al., Bioresource Technology 83 (2002), 1-11). Термин "лигноцеллюлозная биомасса" необходимо отличать от трансформированной биомассы или вторичной биомассы, которая в значительной степени содержит гидролизованные продукты предварительно обработанной биомассы.

Примеры лигноцеллюлозной биомассы включают древесный или растительный материал, получаемый из многочисленных типов растений, включая мискант (китайский тростник), коноплю, сахарную свеклу, пшеницу, кукурузу, тополь, иву, сорго, сахарный тростник и множество видов деревьев, от эвкалипта до масличной пальмы.

В используемом здесь значении термин "производные биомассы" обозначает композицию, включающую молекулы, происходящие из лигноцеллюлозной биомассы, такие как лигнин, целлюлоза, гемицеллюлоза.

В контексте настоящего изобретения термин "бактерии" включает дикий тип или природные варианты штаммов бактерий, например, штаммы, полученные путем ускоренной эволюции, способами перестановки в ДНК, или рекомбинантные штаммы, полученные путем встраивания эукариотической, прокариотической и/или синтетической нуклеиновой кислоты.

Термин "экстракт бактерий" обозначает любую фракцию, полученную из бактерий, такую как клеточный супернатант, клеточный дебрис, клеточные стенки, экстракт ДНК, ферменты или ферментный препарат или любой другой препарат, полученный из бактерий путем химической, физической и/или ферментативной обработки, который в значительной степени освобожден от живых бактерий. Бактериальный экстракт предпочтительно сохраняет ферментативную активность бактерий, наиболее предпочтительно способность гидролизовать лигноцеллюлозную биомассу.

В контексте настоящего изобретения термин "биоэнергия" обозначает возобновляемую энергию, получаемую из биомассы. Более конкретно, термин "биоэнергетические продукты" включает "виды биотоплива" и все конечные продукты модификации биомассы или производные биомассы, которые могут использоваться в качестве топлива, такие как этанол, пропанол, бутанол, глицерин, бутандиол и пропандиол.

Термин "метаболиты" обозначает все возможные промежуточные молекулы, образующиеся в процессе превращения биомассы или производных биомассы в биоэнергетические продукты, включая, но ими не ограничиваясь, некоторые химические продукты, имеющие промышленное значение, такие как органические кислоты и строительные блоки, такие как уксусная кислота, пропионовая кислота, пировиноградная кислота, масляная кислота, молочная кислота и/или янтарная кислота.

Настоящее изобретение касается композиции и способов производства биоэнергии из лигноцеллюлозной биомассы или производных лигноцеллюлозной биомассы. Более конкретно, настоящее изобретение касается применения бактерий для модификации лигноцеллюлозной биомассы с целью получения биоэнергетических продуктов и метаболитов.

Настоящее изобретение теперь впервые демонстрирует, что из источников в окружающей среде могут быть выделены бактерии, которые способны производить биоэнергетические продукты или метаболиты из лигноцеллюлозной биомассы.

В этом отношении цель настоящего изобретения заключается в способе выделения или идентификации бактерий, включающем следующие стадии:

- а) взятие образца, включающего бактерии;
- б) обработка образца для разрушения клеток и повреждения ДНК; и
- в) выделение из указанного обработанного образца бактерий, которые обладают способностью жить или расти в присутствии лигнина, целлюлозы, гемицеллюлозы или ксилана в качестве источника углерода.

Данный способ может осуществляться с разнообразными образцами, включающими неохарактеризованные бактерии, в частности с образцами, которые представляют собой или происходят из образца из окружающей среды. В контексте настоящего изобретения образцы из окружающей среды включают любой образец, содержащий (множество) неохарактеризованных (микро)организмов, в частности, не культивированных микроорганизмов (например, микроорганизмов, которые специально не культивировались и не выращивались в изолированном виде). Образец может быть получен или происходить из природной окружающей среды или из искусственно или специально созданной окружающей среды.

Как указано, образцом может быть любой образец из окружающей среды, такой как образец, полученный или происходящий из почвы, воды, растительного экстракта, биологического материала, осадков, торфяников, промышленных сточных вод или участков, минеральных экстрактов, песка и тому подобное. Образец может быть взят из различных участков или условий, таких как, но ими не ограничиваясь, тропические области, вулканические области, леса, фермы, промышленные зоны и т.д. Образец обычно содержит многочисленные виды (неохарактеризованных, ранее не культивируемых) микроорганизмов, таких как сухопутные микроорганизмы, морские микроорганизмы, пресноводные микроорга-

низмы, симбиотические микроорганизмы, и т.д. Виды таких микроорганизмов из окружающей среды включают бактерии, водоросли, грибы, дрожжи, плесневые грибы (слизевики), вирусы и т.д. Микроорганизмы могут включать экстремофильные организмы, такие как, например, термофилы. Образец обычно включает многочисленные виды таких (не культивируемых) микроорганизмов, а также различные их количества. Кроме того, образец может содержать вдобавок и известные и/или культивируемые микроорганизмы (например, прокариотические или эукариотические).

Необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается каким-либо определенным типом образца или микроорганизма из окружающей среды, но может осуществляться с применением любого образца, включающего ранее не культивируемые микроорганизмы.

В предпочтительном воплощении образец представляет собой или происходит из почвы, воды, горячих источников, морской среды, грязи, дерева, камня, мха, растительного экстракта, лишайника, биологического материала, осадков, биопленок, промышленных сточных вод, газа, песка, масла, канализационных сточных вод или экскрементов животного или человека.

Для применения в настоящем изобретении образец может быть влажным, растворимым, сухим, в форме любой суспензии, пасты и т.д. Кроме того, перед стадией б) данного способа образец может быть обработан для улучшения процесса, например, чтобы обогатить его микроорганизмами, например, с помощью фильтрации, промываний, концентрирования, разведения, перемешивания, высушивания и т.д.

В конкретном воплощении образец находится в форме профильтрованной суспензии. Более конкретно, данный образец может быть стерильно профильтрован и/или помещен в стерильную воду перед началом стадии обработки б).

Стадия б) данного процесса включает подвергание образца (а именно, микроорганизмов, содержащихся в данном образце) обработке, разрушающей клетки и повреждающей ДНК.

Разрушающая клетки и повреждающая ДНК обработка представляет собой обработку, которая вызывает в образце значительную гибель клеток, в отличие от обработок мутагенами, которые приводят к модификациям ДНК. В частности, разрушающая клетки и повреждающая ДНК обработка представляет собой обработку, которая достаточна для того, чтобы вызвать гибель 90% клеток или более в культуре бактерий *E.coli*. Даже более предпочтительно, разрушающая клетки и повреждающая ДНК обработка представляет собой обработку, которая достаточна для того, чтобы снизить, по меньшей мере, на 2 log титр бактерий в культуре *E.coli*. Настоящее изобретение неожиданно показало, что такая обработка, которая обычно должна быть летальной для большинства клеточных популяций, обеспечивает эффективное и быстрое выделение новых микроорганизмов из различных типов образцов, таких микроорганизмов, которые обладают неожиданными свойствами. Этот результат является совершенно неожиданным, поскольку ожидалось, что такая разрушающая клетки и повреждающая ДНК обработка должна предотвращать выделение живых микроорганизмов.

Повреждающая ДНК обработка может включать подвергание образца облучению(ям) и/или действию одного или нескольких генотоксических агентов. Данная обработка проводится в условиях и/или в течение периода времени, достаточного для того, чтобы вызвать гибель значительного числа клеток микроорганизмов, присутствующих в образце.

В конкретном воплощении повреждающая ДНК обработка включает подвергание образца одному или нескольким облучениям. Предпочтительная обработка включает подвергание образца (то есть микроорганизмов в образце) повторяющимся последовательным облучениям.

Облучение может выбираться из УФ, гамма и/или рентгеновского облучения, либо по отдельности, либо в комбинациях, наиболее предпочтительно представляет собой УФ облучение(ия). Обработка облучением обычно включает подвергание микроорганизмов одному или нескольким последовательным облучениям (например, от 1 до 5), которые могут быть одинаковыми или разными по своей природе, предпочтительно одинаковыми по природе.

Особенно предпочтительная обработка включает подвергание образца разрушающему клетки УФ-облучению. Настоящее изобретение действительно показало, что такая обработка позволяет выделить с высокой эффективностью из образцов из окружающей среды (например, почвы или воды) представленные в малом количестве виды бактерий, обладающие замечательными ферментативными активностями. Разрушающие клетки УФ-обработки обычно проводятся при интенсивности от 0,5 до 400 мДж/см², более предпочтительно от 1 до 200 мДж/см², обычно от 1 до 100 мДж/см². Предпочтительная УФ-обработка проводится при 4 мДж/см². Повторные обработки облучением обычно проводятся с интервалом от 1 до 8 ч, предпочтительно от 3 до 5 ч, более предпочтительно около 4 ч.

В конкретном воплощении разрушающая клетки и повреждающая ДНК обработка включает подвергание образца по меньшей мере 2, предпочтительно по меньшей мере 3 УФ-обработкам с интенсивностью от 0,5 до 400 мДж/см² каждая, предпочтительно примерно 4 мДж/см² каждая, которые проводятся с интервалом от 1 до 8 ч, предпочтительно от 3 до 5 ч и более предпочтительно около 4 ч.

В альтернативном способе разрушающая клетки и повреждающая ДНК обработка включает контактную обработку образца генотоксическим агентом, таким как растворитель, митомицин или H₂O₂. Необходимо понимать, что генотоксические агенты могут также применяться в комбинации с облучением.

В процессе фазы обработки образец предпочтительно помещается в подходящую культуральную среду, такую как, без ограничений, PGY (Васто-пептон 10 г/л, Дрожжевой экстракт 5 г/л, глюкоза 1 г/л) или LB (Васто-триптон 10 г/л, Дрожжевой экстракт 2,5 г/л, Хлорид натрия 10 г/л). Необходимо понимать, что подходящие культуральные среды известны специалистам в данной области техники (Buchanan et al, 1974, Difco, 1995) или могут быть приготовлены специалистом в данной области техники из таких известных сред.

Стадия обработки б) обычно проводится в твердой или полутвердой культуральной среде, такой как в присутствии геля (например, агара). Наиболее предпочтительная среда для обработки включает агаризованную культуральную среду, такую как мягкая агаровая культуральная среда. В конкретном воплощении для выращивания бактерий применяется агаризованная среда PGY. Однако также могут применяться другие твердые среды, содержащие источник углерода, источник азота и минеральные соли. Могут также применяться способы последовательных разведений согласно Schoenborn et al. (2004).

На стадии в) в обработанном образце идентифицируют или выделяют из него живые или растущие бактерии. Живые или растущие бактерии могут быть идентифицированы разными способами, которые сами по себе известны в данной области техники. В конкретном воплощении идентифицируются колонии, которые образуются в культуральной среде. Живые или растущие бактерии могут быть выделены и помещены в свежую среду для дальнейшего культивирования или размножения.

В предпочтительном воплощении бактерии на стадии б) культивируются в минимальной среде, включающей в качестве единственного источника углерода лигнин (предпочтительно 0,05-3 вес.%), целлюлозу (предпочтительно 0,5-3 вес.%), и/или ксилан (предпочтительно 0,5-3 вес.%). Лигнин, целлюлоза и ксилан могут быть получены из коммерческих источников (лигнин: Sigma, France; СМС и ксилан: Fluka, France). Источники минимальной среды указаны в примерах. Могут применяться и другие минимальные среды, как описано ранее (Rainey F.A., et al. 2005. Appl Environ Microbiol. 71 (9): 5225-35; Ferreira A.C., et al., 1997. Int J Syst Bacteriol. 47(4): 939-47; Kongpol A. et al., 2008. FEMS Microbiol Lett. 286(2): 227-235).

Способы настоящего изобретения могут включать одну или несколько дополнительных стадий отбора бактерий, обладающих определенными свойствами. Более конкретно, в предпочтительном воплощении данный способ дополнительно включает одну или несколько стадий отбора бактерий, которые являются жизнеспособными или растут в селективных культуральных условиях, таких как среда, температура, рН, соленость, питательные вещества, снабжение кислородом или источник углерода.

Для этого образец или бактерии могут быть помещены в подходящие селективные условия во время любой одной из стадий б) или в), или во время предшествующей или последующей стадии, и результирующее свойство отбирается в течение любой из этих стадий.

В конкретном аспекте настоящего изобретения бактерии культивируются в определенных температурных условиях для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти в диапазоне температур от примерно 4 до 70°C. Более конкретно, бактерии содержатся при селективной температуре во время стадий б) и/или в), и/или во время дополнительной стадии для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти при данной желаемой температуре.

В другом конкретном аспекте настоящего изобретения бактерии культивируются в определенных условиях солености для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти в условиях концентрации NaCl или эквивалентных солей, возможно достигающей примерно 5% вес/объем. Более конкретно, бактерии содержатся при селективной солености во время стадий б) и/или в), и/или во время дополнительной стадии для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти при данной желаемой солености.

В другом конкретном и предпочтительном воплощении настоящего изобретения бактерии культивируются при определенных условиях рН для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти в интервале значений рН от примерно 3 до 9,5, предпочтительно от 4 до 8. Более конкретно, бактерии содержатся при селективном значении рН во время стадий б) и/или в); и/или во время дополнительной стадии для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти при данном желаемом значении рН.

В другом конкретном воплощении настоящего изобретения бактерии культивируются в определенных условиях снабжения кислородом для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти в аэробных и/или анаэробных условиях. Более конкретно, бактерии содержатся при селективных условиях снабжения кислородом во время стадий б) и/или в); и/или во время дополнительной стадии для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти при определенных желаемых условиях.

В другом конкретном воплощении настоящего изобретения бактерии культивируются в определенной культуральной среде для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти в присутствии выбранного источника углерода. Более конкретно,

бактерии выращиваются на данной среде во время стадий б), в) и/или г), и/или во время дополнительной стадии д) для того, чтобы идентифицировать или выделить бактерии, которые являются жизнеспособными или могут расти, используя желаемый источник углерода.

Необходимо понимать, что указанные выше свойства могут отбираться по отдельности или в любой комбинации. Например, способ может применяться для идентификации бактерий, которые являются жизнеспособными или могут расти при желаемых температуре и солености, или при желаемых температуре и значении pH, или при желаемых температуре, значении pH и условиях снабжения кислородом.

Кроме того, способы настоящего изобретения могут включать дополнительные стадии модификации, например, либо биологически, генетически и/или химически, идентифицированных или выделенных бактерий, или их ДНК, любым способом, который сам по себе известен в данной области техники, где указанная модификация имеет целью, например, улучшить жизнеспособность, рост или функции указанных бактерий, например, ферментативную активность. Такая стадия модификации включает, без ограничений, слияние клеток, ускоренную эволюцию, перестановки в ДНК, мутагенез, вставку эукариотической, прокариотической или синтетической нуклеиновой кислоты (например, ДНК) из другого штамма, или любую технологию генетической инженерии. Данная модификация может также включать стадию введения маркерного гена (например, маркера устойчивости к канамицину) в бактерии. Указанная стадия модификации может проводиться с изолированными бактериями или на любой более ранней стадии указанного выше способа, например, с образцом на стадии а).

Дополнительной целью настоящего изобретения являются бактерии, получаемые указанным выше способом.

Более конкретно, целью настоящего изобретения являются выделенные бактерии, которые обладают способностью расти в присутствии лигнина, или целлюлозы, или ксилана в качестве единственного источника углерода при температуре по меньшей мере 30°C и быть устойчивыми к УФ-обработке с интенсивностью 4 мДж/см². Комбинация этих свойств является беспрецедентной и обеспечивает новые возможности по переработке лигноцеллюлозной биомассы. В частности, способность выдерживать указанную выше УФ-обработку и расти при температуре 30°C или выше позволяет применять данные бактерии в специфических жестких условиях промышленного процесса, совместимых с природой биомассы. Способность расти в присутствии лигнина, целлюлозы или ксилана в качестве единственного источника углерода (то есть использовать лигнин, целлюлозу или ксилан в качестве источника углерода) делает данные бактерии пригодными для переработки любого типа лигноцеллюлозной биомассы.

В дополнительном предпочтительном воплощении бактерии обладают способностью использовать лигнин, целлюлозу и ксилан в качестве источника углерода. Действительно, авторы настоящего изобретения идентифицировали бактерии, которые обладают способностью разлагать все главные компоненты лигноцеллюлозной биомассы.

Кроме того, как показано в экспериментальном разделе, авторами настоящего изобретения были идентифицированы бактерии, которые способны расти либо в аэробных, либо в анаэробных условиях, или и в тех, и в других. В конкретном и преимущественном воплощении настоящее изобретение касается бактерий, как определено выше, которые могут быть выращены, или культивироваться как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Настоящее изобретение действительно неожиданно показывает, что бактерии могут работать в условиях, таких как анаэробные условия, пригодных для производства больших количеств биоэнергетических продуктов или метаболитов из различных субстратов. Таким образом, настоящее изобретение предоставляет новые способы и композиции для производства биоэнергетических продуктов или метаболитов из лигноцеллюлозной биомассы и/или компонентов лигноцеллюлозной биомассы, а именно целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, очень эффективным способом.

Предпочтительные бактерии настоящего изобретения могут гидролизовать лигноцеллюлозную биомассу с получением сбраживаемых сахаров и могут культивироваться в аэробных или анаэробных условиях.

Бактерии настоящего изобретения предпочтительно принадлежат к родам, выбираемым из *Deinococcus*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Methylobacterium*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Caldimonas*, *Paenibacillus*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingobium*, *Sphingopyxis* или *Porphyrobacter*.

Предпочтительные бактерии настоящего изобретения обладают следующими свойствами:
жизнеспособны или функциональны при высоких температурах (например, около 30-70°C),
жизнеспособны или функциональны в аэробных условиях,
устойчивы к УФ-обработке в 4 мДж/см² и
способны обеспечивать расщепление целлюлозы с получением глюкозы.

Другие предпочтительные бактерии настоящего изобретения обладают следующими свойствами:
жизнеспособны или функциональны при высоких температурах (например, около 30-70°C),
жизнеспособны или функциональны в анаэробных условиях,
устойчивы к УФ-обработке в 4 мДж/см² и
способны использовать лигнин в качестве источника углерода.

Другие предпочтительные бактерии настоящего изобретения обладают следующими свойствами:

жизнеспособны или функциональны при высоких температурах (например, около 30-70°C),
жизнеспособны или функциональны в анаэробных условиях,
устойчивы к УФ-обработке в 4 мДж/см² и
способны использовать ксилан в качестве источника углерода.

Другие предпочтительные бактерии настоящего изобретения обладают следующими свойствами:
жизнеспособны или функциональны при высоких температурах (например, около 30-70°C),
жизнеспособны или функциональны в анаэробных условиях,
устойчивы к УФ-обработке в 4 мДж/см²;
способны использовать лигнин в качестве источника углерода и
способны обеспечивать расщепление целлюлозы с получением глюкозы; и/или
способны обеспечивать расщепление ксилана с получением ксилозы; и/или
способны использовать ксилан в качестве источника углерода.

Бактерии могут содержаться или культивироваться в подходящей культуральной среде, такой как, без ограничений, PGY (Васто-пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, глюкоза 1 г/л) или LB (Васто-триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 2,5 г/л, хлорид натрия 10 г/л). Необходимо понимать, что другие подходящие культуральные среды известны специалистам в данной области техники (Buchanan et al., 1974, Difco, 1995) или могут быть приготовлены специалистом в данной области техники из таких известных сред.

Конкретные иллюстративные примеры бактерий настоящего изобретения приведены в экспериментальном разделе вместе со способом их выделения и их свойствами. Необходимо понимать, что другие бактерии могут быть выделены или охарактеризованы согласно настоящему изобретению.

Дополнительная цель настоящего изобретения заключается в применении бактерий согласно настоящему изобретению, или экстрактов из них, для производства ценных продуктов из лигноцеллюлозной биомассы.

В этой связи настоящее изобретение касается применения такой бактерии, или экстракта из нее, для гидролиза лигноцеллюлозной биомассы.

Настоящее изобретение также касается применения таких бактерий, или экстракта из нее, для превращения лигноцеллюлозной биомассы в биоэнергетические продукты или метаболиты.

Настоящее изобретение также касается способа разложения лигноцеллюлозной биомассы до сбраживаемых сахаров, включающего обработку указанной лигноцеллюлозной биомассы бактериями настоящего изобретения или экстрактом из них.

Способ особенно подходит для получения сбраживаемых сахаров, выбираемых из глюкозы, целлобиозы, маннозы, ксилозы, арабинозы или галактозы.

Другой целью настоящего изобретения является реактор или ферментер, включающий лигноцеллюлозную биомассу и бактерии настоящего изобретения или экстракт из них.

Другой целью настоящего изобретения является способ получения биоэнергетических продуктов или метаболитов, в частности, этанола, включающий обработку лигноцеллюлозной биомассы бактериями настоящего изобретения или экстрактом из них. Способ предпочтительно дополнительно включает стадию сбора указанных биоэнергетических продуктов или метаболитов.

Другой целью настоящего изобретения является биоэнергетический продукт или метаболит, полученный указанными выше способами.

Культивирование или обработка могут проводиться в любых подходящих условиях или в любом окружении, которые обеспечивают превращение лигноцеллюлозной биомассы для получения биоэнергетических продуктов или метаболитов. В этой связи, способ может осуществляться в реакторе, в ферментере, вне помещения, в присутствии подходящих питательных веществ или добавок, если это необходимо. Способ обычно осуществляется при определенных значениях pH, температуре выше 40°C и в присутствии подходящих субстратов.

В указанных выше способах стадия культивирования и/или выращивания бактерий и стадия превращения биомассы в биоэнергетические продукты или метаболиты могут проводиться либо одновременно, либо последовательно; и стадия сбора биоэнергетических продуктов или метаболитов может проводиться одновременно с первой и/или второй стадией, или последовательно. В этой связи, биомасса может обрабатываться данными бактериями в подходящих условиях, чтобы обеспечить размножение данных бактерий, увеличивая таким образом эффективность данного способа. Альтернативно этому бактериальные штаммы могут размножаться отдельно, в подходящих условиях культивирования, и после этого добавляться к биомассе. Необходимо понимать, что точные количества бактерий, изначально добавляемые для эффективного превращения биомассы в значительные количества биоэнергетических продуктов или метаболитов, могут подбираться специалистом в данной области техники в зависимости от типа бактерий, типа биомассы и условий культивирования.

В конкретном воплощении данного способа процесс выращивания бактерий отделен от процесса превращения биомассы.

В конкретном воплощении способ настоящего изобретения осуществляется в реакторе для превращения биомассы. Под "реактором" понимается обычная емкость для ферментации или любой аппарат

Система HPLC Gilson с автоматическим инжектором, регистрация с помощью рефрактометрии,
 Колонка: Phenomenex Rezex ROA, 300 мм × 7,8 мм.
 Температура колонки: 65°C.
 Подвижная фаза: 0,005 Н серная кислота.
 Скорость тока: 0,600 мл/мин.

Сначала строится калибровочная кривая путем введения в колонку культуральной среды, содержащей известные концентрации этанола. Измеряется площадь пика, который элюируется через 22,26 мин и соответствует этанолу, после чего строится калибровочная кривая.

Затем измеряется количество этанола, произведенного бактериями, путем внесения в колонку культурального супернатанта. Измеряется площадь пика, который элюируется через 22,26 мин и соответствует этанолу. Концентрация этанола, имеющегося в супернатанте, рассчитывается по калибровочной кривой.

Выявление и количественное определение других метаболитов, возможно продуцируемых в разных пропорциях, могут быть сделаны стандартными методами анализа и определения.

Пример 1. Отбор термофильных УФ-устойчивых бактерий, которые используют целлюлозу в качестве источника углерода и растут в условиях анаэробнобиоза (фиг. 1)

Термофильные бактерии, отобранные по их устойчивости к УФ и выделенные из образцов из окружающей среды (3 обработки 4 мДж/см² с интервалом в 4 ч), инокулировали на твердую минимальную культуральную среду, стерилизованную автоклавированием (15 мин при 120°C), содержащую представляющий интерес источник углерода в концентрации 1%: карбоксиметилцеллюлозу (СМС; Fluka, France) или ксилан из древесины березы (Fluka, France). Минимальная культуральная среда была приготовлена на буферном растворе MOPS с pH 7 и профильтрована: кислый MOPS буфер 40 мМ (Sigma, France), NH₄Cl 20 мМ, КОН 10 мМ, NaOH 10 мМ, CaCl₂ 0,5 мкМ, Na₂SO₄ 0,276 мМ, MgCl₂ 0,528 мМ), раствор микроэлементов с pH 5 ((NH₄)₆(MO₇)₂₄ 3 нМ, H₃BO₃ 400 нМ, CoCl₂ 30 нМ, CuSO₄ 10 нМ, MnCl₂ 250 нМ, ZnSO₄ 10 нМ), раствор витаминов с pH 4 (1 мкг/л D-биотин, ниацин, пиридоксаль-НCl, тиамин-НCl и витамин B12), раствор K₂HPO₄ с концентрацией 5,7 мМ, а также раствор FeCl₃ с концентрацией 20 мкМ в растворе NaH₂(C₃H₅O(COO)₃).

Условия анаэробнобиоза поддерживались с помощью генератора для инкубации анаэробов GENbag anaer (BioMerieux, France). После инкубации в условиях анаэробнобиоза при 45°C в течение 4-5 дней становились видимыми колонии, использующие источник углерода, присутствующий в культуральной среде (см. фиг. 1).

Устойчивые к УФ бактерии, обозначенные как M11-2F, способны расти в условиях анаэробнобиоза при 45°C с использованием СМС в качестве единственного источника углерода.

Таким образом, эти бактерии способны превращать лигноцеллюлозную биомассу в полезные продукты в промышленных условиях.

Пример 2. Отбор термофильных УФ-устойчивых бактерий, которые используют ксилан в качестве источника углерода в условиях анаэробнобиоза (фиг. 2)

Термофильные бактерии, отобранные по их устойчивости к УФ и выделенные из образцов из окружающей среды (3 обработки 4 мДж/см² с интервалом в 4 ч), инокулировали на твердую минимальную культуральную среду, стерилизованную автоклавированием (15 мин при 120°C), содержащую представляющий интерес источник углерода в концентрации 1%: карбоксиметилцеллюлозу (СМС; Fluka, France) или ксилан из древесины березы (Fluka, France). Минимальная культуральная среда была приготовлена на буферном растворе MOPS с pH 7 и профильтрована: кислый MOPS буфер 40 мМ (Sigma, France), NH₄Cl 20 мМ, КОН 10 мМ, NaOH 10 мМ, CaCl₂ 0,5 мкМ, Na₂SO₄ 0,276 мМ, MgCl₂ 0,528 мМ), раствор микроэлементов с pH 5 ((NH₄)₆(MO₇)₂₄ 3 нМ, H₃BO₃ 400 нМ, CoCl₂ 30 нМ, CuSO₄ 10 нМ, MnCl₂ 250 нМ, ZnSO₄ 10 нМ), раствор витаминов с pH 4 (1 мкг/л D-биотин, ниацин, пиридоксаль-НCl, тиамин-НCl и витамин B12), раствор K₂HPO₄ с концентрацией 5,7 мМ, а также раствор FeCl₃ с концентрацией 20 мкМ в растворе NaH₂(C₃H₅O(COO)₃).

Условия анаэробнобиоза поддерживались с помощью генератора для инкубации анаэробов GENbag anaer (BioMerieux, France). После инкубации в условиях анаэробнобиоза при 45°C в течение 4-5 дней становились видимыми колонии, использующие источник углерода, присутствующий в культуральной среде (см. фиг. 2).

Устойчивые к УФ бактерии, обозначенные как M11-3C, способны расти в условиях анаэробнобиоза при 45°C с использованием ксилана из древесины березы в качестве единственного источника углерода.

Устойчивые к УФ бактерии, обозначенные как M11-9D, способны расти в условиях анаэробнобиоза при 45°C в культуральной среде, содержащей либо СМС, либо ксилан в качестве источника углерода.

Таким образом, эти бактерии способны превращать лигноцеллюлозную биомассу в полезные продукты в промышленных условиях.

Пример 3. Отбор устойчивых к УФ бактерий, которые способны использовать лигнин в качестве источника углерода (фиг. 3)

Бактерии, отобранные по их устойчивости к УФ и выделенные из образцов из окружающей среды (3 обработки 4 мДж/см² с интервалом в 4 ч), инокулировали на твердую минимальную культуральную

среду, содержащую лигнин в концентрации 0,1% (Sigma, France). Состав минимальной культуральной среды описан в предшествующих Примерах. После инкубации при 30°C в течение 4-5 дней становились видны колонии, использующие лигнин, присутствующий в культуральной среде, в качестве источника углерода (бактерии, которые разлагают лигнин, обесцвечивают среду).

Результаты приведены на фиг. 3 и в приведенных ниже табл. 1 и 2.

Таблица 1

Биотоп	Название штамма	Температура выделения	Среда выделения	Ближайшие культивируемые соседи	Аэриобиоз Лигнин	Анаэриобиоз СМС + Ксилан	
Окружающая среда	Strain						
Перегной	M5-6H	30°C	PGY	<i>Bacillus</i>	+	+	
Фекалии животных	M6-2H	30°C	PGY	<i>Microbacterium</i>	+	+	
Камни	M6-4H	30°C	PGY	<i>Cellulosimicrobium</i>	+	+	
	M8-1B	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-1H	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-2B	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-3A	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-3C	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-4A	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-4B	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-4H	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-5A	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-5B	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-6G	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	M8-7E	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+	
	мох	M8-9E	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
		M8-9H	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
		M8-11C	30°C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
фекалии животных	M9-2E	30°C	PGY	<i>Sphingobacterium</i>	+	+	
	M9-3E	30°C	PGY	<i>Sphingobacterium</i>	+	+	
	M9-3F	30°C	PGY	<i>Sphingobacterium</i>	+	+	
фекалии коров	M9-7D	30°C	PGY	<i>Pseudomonas</i>	+	+	
	M9-7E	30°C	PGY	Некультивируемые ранее бактерии, выделенные из фекалий архаров (<i>Argalis</i>)	+	+	

Таблица 2

Биотоп	Название	Температура выделения	Среда выделения	Ближайшие культивируемые соседи	Источник углерода					
					Аэриобиоз			Анаэриобиоз		
					СМС	Ксилан	Лигнин	СМС	Ксилан	Лигнин
Вода	MX1-1B	45°C	MM+X y1 1%	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	+
Вода	MX1-6G	45°C	MM+X y1 1%	<i>Caldimonas</i>	+	+	+	+	+	-
Вода	MX1-7B	45°C	MM+X y1 1%	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	+	+	+
Вода	MX1-7C	45°C	MM+X y1 1%	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	+	+	+
Вода	MC1-1D	45°C	MM+C MC 1%	<i>Gordonia</i>	+	+	+	+	+	-
Вода	MC1-1G	45°C	MM+C MC 1%	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	-	-	-
Вода	MC1-2A	45°C	MM+C MC 1%	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	+	-
Осадок	MC1-2D	45°C	MM+C MC 1%	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	-	+	-
Вода	M10-1D	30°C	PGY	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	nd	nd	nd
	M10-1E	30°C	PGY	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	nd	nd	nd
	M10-8D	30°C	PGY	<i>Stenotrophomonas</i>	+	+	+	nd	nd	nd

nd - не определяли

Таким образом, все эти бактерии способны превращать лигноцеллюлозную биомассу в полезные продукты в промышленных условиях. Использование лигнина в качестве источника углерода бактериями, принадлежащими к родам *Sphingobacterium*, *Microbacterium* или *Cellulosimicrobium*, до настоящего времени никогда не было описано.

Пример 4. Превращение лигноцеллюлозной биомассы

Образец бактерий из жидкой культуры, полученной на богатой среде, промывали деионизированной водой перед инокулированием (1/10) 20 мл минимальной среды, содержащей кислый MOPS буфер 40 мМ (Sigma, France), NH₄Cl 20 мМ, KOH 10 мМ, NaOH 10 мМ, CaCl₂ 0,5 мкМ, Na₂SO₄ 0,276 мМ, MgCl₂ 0,528 мМ, раствор микроэлементов с pH 5 ((NH₄)₆(MO₇)₂₄ 3 нМ, H₃BO₃ 400 нМ, CoCl₂ 30 нМ, CuSO₄ 10 нМ, MnCl₂ 250 нМ, ZnSO₄ 10 нМ), раствор витаминов с pH 4 (1 мкг/л D-биотин, ниацин, пиридоксаль-HCl, тиамин-HCl и витамин B12), раствор K₂HPO₄ с концентрацией 5,7 мМ, а также раствор FeCl₃ с концентрацией 20 мкМ, приготовленный на растворе MaH₂(C₃H₅O(COO)₃).

Бумажный журнал и/или бумага Whatman использовались в качестве источника лигноцеллюлозной биомассы и источника углерода. В культуральную среду, описанную выше, было добавлено примерно 140 мг журнальной бумаги. Разложение журнальной бумаги и/или бумаги Whatman регистрировалось в

течение нескольких недель и сравнивалось с контрольной пробиркой (без каких либо бактерий в культуральной среде).

Результаты представлены на фиг. 4. Штамм *Deinosoccus* DRH46 способен разлагать журнальную бумагу и/или бумагу Whatman. Деграция заметна по появлению бумажных волокон в культуральной среде, которая становится мутной через несколько недель роста бактерий (по сравнению с контрольной пробиркой).

Пример 5. Отбор устойчивых к УФ разлагающих целлюлозу и ксилан *Deinosocci*, продуцирующих регистрируемый уровень этанола

Бактерии, отобранные по их устойчивости к УФ и выделенные из образцов из окружающей среды (3 обработки 4 мДж/см² с интервалом в 4 ч), инокулировали при 45°C в минимальную жидкую среду, содержащую фильтровальную бумагу Whatman I или ксилан в качестве единственного источника углерода и лигноцеллюлозного субстрата. Состав минимальной культуральной среды описан в предшествующих примерах. Бумага Whatman I разлагается через несколько недель инкубации с бактериями при 45°C, тогда как никакой деграции фильтровальной бумаги Whatman I не наблюдается при такой же обработке, как описано выше, но в отсутствие бактерий (контроль). Кроме того, через несколько дней инкубации при 45°C наблюдалось увеличение мутности культуральной среды, содержащей бактерии, выращиваемые на ксилане в качестве единственного источника углерода, что указывает на рост бактерий в таких условиях по сравнению с контрольной средой, не содержащей бактерии. После этого были определены метаболические свойства данных штаммов для оценки их способности продуцировать этанол. Среди множества идентифицированных штаммов могут быть отмечены следующие штаммы, которые разлагают целлюлозу, разлагают ксилан и продуцируют этанол.

Виды	Название штамма	Крахмал	Сахароза	Ксилан	Whatman I	Глюкоза	Продукция EtOH (%)
<i>D. thirgaui</i>	M13-8D	+	+	+	+	+	0,016

Этот пример дополнительно иллюстрирует эффективность способа настоящего изобретения и возможность выделять бактерии, обладающие выбранными выдающимися свойствами, при приложении указанного способа к разным образцам.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отбора или выделения бактерий, устойчивых к УФ и способных расти в присутствии лигнина, целлюлозы и/или ксилана в качестве единственного источника углерода, включающий следующие стадии:

- а) получение образца, содержащего неохарактеризованные бактерии;
- б) по меньшей мере двукратное УФ-облучение образца с интенсивностью от 0,5 до 400 мДж/см² с интервалом от 1 до 8 ч, снижающим по меньшей мере на 2 log бактериальный титр в культуре *E. coli*; и
- в) культивирование бактерий из образца в среде, содержащей в качестве единственного источника углерода лигнин, целлюлозу и/или ксилан; и
- г) выделение бактерий, способных расти в присутствии лигнина, целлюлозы и/или ксилана в качестве единственного источника углерода.

2. Способ по п.1, где образец получают из окружающей среды.

3. Способ по п.1, где образец получают из биологических материалов.

4. Способ по п.1, где образец получают из почвы, воды, горячих источников, дерева, поверхности камня, мха, лишайника, торфяников, промышленных сточных вод, песка, канализационных сточных вод, экскрементов животного или человека.

5. Способ по любому из пп.1-4, где УФ-облучение образца проводят с интенсивностью от 1 до 200 мДж/см².

6. Способ по любому из пп.1-4, где УФ-облучение образца проводят с интенсивностью от 1 до 100 мДж/см².

7. Способ по любому из пп.1-5, где стадию б) проводят на твердой культуральной среде.

8. Способ по любому из пп.1-6, где стадии б) и в) проводят последовательно или одновременно.

9. Способ по любому из пп.1-8, который дополнительно включает стадию генной модификации выделенных бактерий с целью улучшения жизнеспособности, роста или функций указанных бактерий.

10. Способ по любому из пп.1-8, который дополнительно включает стадию модификации выделенных бактерий перестановками в ДНК, мутагенезом или вставкой эукариотических, прокариотических или синтетических нуклеиновых кислот из другого штамма.

11. Способ по любому из пп.1-10, где стадия в) включает отбор бактерий, которые растут в присутствии лигнина в качестве единственного источника углерода.

12. Бактерии, полученные способом по любому из пп.1-11.

13. Бактерии по п.12, способные расти в присутствии лигнина в качестве единственного источника углерода при температуре по меньшей мере 30°C и устойчивые к УФ-облучению с интенсивностью 4

мДж/см².

14. Бактерии по п.12, способные использовать целлюлозу и ксилан в качестве единственного источника углерода при температуре по меньшей мере 30°C и устойчивые к УФ-облучению с интенсивностью 4 мДж/см².

15. Бактерии по п.13 или 14, способные использовать лигнин, целлюлозу и ксилан в качестве единственного источника углерода.

16. Бактерии по п.13 или 14, способные гидролизовать лигноцеллюлозную биомассу для получения сбраживаемых сахаров.

17. Бактерии по любому из пп.12-16, способные к культивированию в аэробных и анаэробных условиях.

18. Бактерии по любому из пп.12-17, которые принадлежат к роду, выбранному из *Deinococcus*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Methylobacterium*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Caldimonas*, *Paenibacillus*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingobium*, *Sphingorhixis* или *Porphyrobacter*.

19. Применение бактерий по любому из пп.12-18 для гидролиза лигноцеллюлозной биомассы.

20. Способ гидролиза лигноцеллюлозной биомассы в сбраживаемые сахара, включающий стадию обработки указанной лигноцеллюлозной биомассы бактериями по любому из пп.12-18.

21. Способ по п.20, где сбраживаемый сахар выбирают из глюкозы, целлобиозы, маннозы, ксилозы, арабинозы или галактозы.

22. Применение бактерий по любому из пп.12-18 для получения спиртов или органических кислот.

23. Применение по п.22, в котором спирты выбирают из группы, включающей этанол, пропанол, бутанол, глицерин, бутандиол и пропандиол.

24. Применение по п.22, в котором органические кислоты выбирают из группы, включающей уксусную кислоту, пропионовую кислоту, пировиноградную кислоту, масляную кислоту, молочную кислоту и янтарную кислоту.

25. Способ получения спиртов или органических кислот, включающий следующие стадии:

а) обработка лигноцеллюлозной биомассы бактериями по любому из пп.12-18 для получения сбраживаемых сахаров;

б) сбраживание указанных сахаров в спирты или органические кислоты и

в) сбор указанных спиртов или органических кислот.

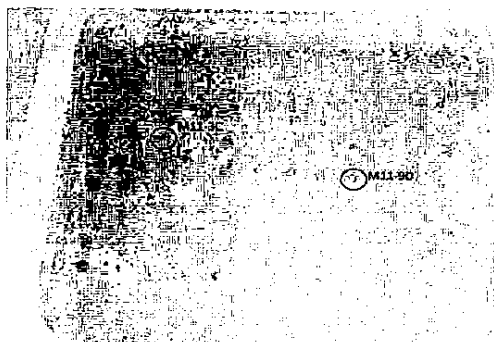
26. Способ по п.25, где сбраживание проводится с применением бактерий по любому из пп.12-18.

27. Способ по любому из пп.25, 26, в котором спирты выбирают из группы, включающей этанол, пропанол, бутанол, глицерин, бутандиол и пропандиол.

28. Способ по любому из пп.25, 26, в котором органические кислоты выбирают из группы, включающей уксусную кислоту, пропионовую кислоту, пировиноградную кислоту, масляную кислоту, молочную кислоту и янтарную кислоту.

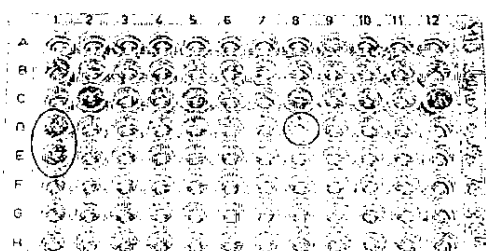


Фиг. 1



Результаты роста устойчивых к УФ термофильных изолятов на среде MM+Ксилан 1% в анаэробных условиях. Обведены изоляты, представленные в Примере 2

Фиг. 2



Результат роста устойчивых к УФ розовых изолятов на среде MM+Лигнин 0,1% в аэробных условиях при 30 °С в течение 5 дней. Обведены изоляты M10-1D и M10-1E, которые способны использовать лигнин в качестве единственного источника углерода, и M10-8D, который способен разрушать лигнин

Фиг. 3



Фиг. 4

