

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 390**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008** **E 08848694 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 2209900**

54 Título: **Uso de bacterias para la producción de bioenergía**

30 Prioridad:

14.11.2007 FR 0708005

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2013

73 Titular/es:

DEINOVE (33.0%)
22 Rue Léon Jouhaux
75010 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.0%) y
UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1 (33.0%)

72 Inventor/es:

LEONETTI, JEAN-PAUL;
MATIC, IVAN;
M. BITON, JACQUES y
M. POULETTY, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 390 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de bacterias para la producción de bioenergía

Campo de la invención

5 La presente invención describe composiciones y métodos para producir bioenergía. De manera más específica, la invención describe el uso de bacterias del género *Deinococcus* y/o géneros relacionados para la modificación de biomasa o derivados de biomasa con el propósito de producir productos de bioenergía y metabolitos.

Antecedentes de la invención

Se conoce el uso de microorganismos para llevar a cabo la modificación de biomasa, básicamente biomasa vegetal, para producir productos de bioenergía, por ejemplo etanol.

10 Los procesos industriales actuales solamente permiten el cultivo y el crecimiento de microorganismos para la fermentación y la extracción de etanol a temperaturas en la región de 30 °C, debido a la fragilidad de los microorganismos industriales (levaduras) usados. También conllevan costes bioenergéticos importantes para concentrar el etanol tras la fermentación, ya que las levaduras usadas actualmente para esta fermentación no pueden resistir concentraciones de más de 100 g/l. Además, la fermentación de estas levaduras usa prácticamente
15 solamente carbohidratos C6, de tipo glucosa.

También se conoce el tratamiento de un material biológico, cepas bacterianas, entre otros, para conferirle propiedades mejoradas.

20 Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.716.631 de S. Del Cardayre *et al.* describe un método basado en ciclos iterativos de recombinación y selección/cribado para conferir propiedades deseadas a células completas y a organismos completos. Las propiedades añadidas son, por ejemplo, una aptitud incrementada para la recombinación genética, un número incrementado de copias del genoma, una capacidad incrementada para expresar y/o secretar proteínas y metabolitos secundarios.

Tomando una aproximación de genética molecular, los autores proponen técnicas para modificar de manera adecuada los genomas de células y organismos para conferirles propiedades nuevas y mejoradas.

25 El método descrito en el documento US 6.716.631 usa una población de células diferentes, el cultivo de estas células para formar células híbridas mediante fusión de protoplastos, después el cribado o la selección de las células que se desarrollan hacia la adquisición de una propiedad deseada, y la repetición de estas etapas hasta que se obtiene al menos una célula que tiene la modificación deseada. Este método se presenta como una alternativa ventajosa a los métodos conocidos basados en un programa de mejora de cepas.

30 Los protoplastos sometidos a dicha fusión pueden derivar de organismos procarióticos.

Una de las aplicaciones previstas en esta patente de EE.UU. es la fermentación para la producción, p.ej., de etanol, cuyo rendimiento y coste se propone mejorar mediante el uso de dicho método de recombinación reordenando aleatoriamente el ADN de los microorganismos usados. A modo de ejemplo, se hace mención a la recombinación homóloga de *Rhodococcus*, que se sabe que cataliza reacciones de dos fases.

35 La solicitud de patente internacional N° WO01/023526 describe la producción y el uso de bacterias resistentes a la radiación y capaces de llevar a cabo la biorremediación, en particular del género *Deinococcus* (en particular *D. radiodurans* y *D. geothermalis*), modificadas para que sean más eficaces para la metabolización, degradación o destoxificación de contaminantes inorgánicos y orgánicos, tales como radionúclidos, metales pesados y disolventes orgánicos. Se recomienda que estas bacterias se manipulen para que expresen enzimas heterólogas capaces de
40 destoxificar dichos elementos. Las cepas bacterianas se manipulan para combinar una diversidad de funciones codificadas por diferentes genes en un único hospedador.

45 La solicitud de patente de EE.UU. de I. Narumi *et al.*, publicada el 18 de septiembre de 2003 con el N° 2003/0175977, describe un plásmido endógeno derivado de una cepa de *D. radiopugnans*, pUE30, que se puede usar como vector capaz de replicarse de manera autónoma en bacterias del género *Deinococcus*, y que se puede usar para construir un vector lanzadera que contiene también un plásmido capaz de replicarse de manera autónoma en *E. coli* y su derivados, y capaz de replicarse en una bacteria del género *Deinococcus* y de *E. coli*.

La patente de EE.UU. N° 7.160.715 de C. B. Fliermans describe medios para medir la distribución y la frecuencia de la generación *in vivo* de rupturas en la cadena de ADN. Estos medios comprenden el uso de una proteína PprA derivada de *Deinococcus radiodurans*.

50 La solicitud de patente de EE.UU. publicada con el N° 2004/0224320 en nombre de K. Satoh *et al* describe una bacteria Gram-positiva (N° de acceso de ATCC BAA-149 o un mutante de la misma) que se aísla y se purifica. El aislado es capaz de degradar una gran variedad de contaminantes orgánicos y es adecuado para la biorremediación de una diversidad de contaminaciones orgánicas, en presencia de radiación ionizante.

Además, se publicó una monografía reciente sobre la producción de etanol mediante el uso de la fermentación con cepas de microorganismos con el título "Ethanol Fermentation Strains" de J.R. Hettenhaus, patrocinado por el United States Department of Energy y el National Renewable Energy Laboratory (16 de diciembre de 1998). En este documento, que resume las contribuciones hechas por los participantes en el estudio relacionado, se señala que:

- 5 - las únicas cepas de microorganismos que se pueden usar en el equipamiento existente deberían ser similares a las ya usadas, concretamente *Saccharomyces*, *Zymomonas* y *E. coli*;
- a corto plazo, la fermentación incrementada de xilosa y arabinosa podría ser el objetivo de interés, especificando sin embargo que tiene poco interés incrementar la eficacia de conversión de los otros carbohidratos de tipo hexosa u oligómeros;
- 10 - a largo plazo, se podrían conseguir beneficios al considerar temperaturas de funcionamiento más altas y combinando las etapas de producción de enzima, sacarificación e hidrólisis.

Por lo tanto, existía la necesidad de un método para fermentar biomasa y para obtener etanol y opcionalmente otros metabolitos, que se pudiera implementar en condiciones de funcionamiento significativamente mejores que las de los métodos actuales, y que al mismo tiempo se pudiera controlar más fácilmente que los métodos conocidos y que fuera capaz de conducir a productos de fermentación que son más baratos y más fáciles de mejorar.

La invención puede proporcionar soluciones a estas expectativas y proporcionar métodos mejorados para extraer un beneficio de la biomasa mediante la producción de productos de bioenergía alternativos, que se están haciendo cada vez más necesarios debido a la reducción significativa de las fuentes de energía de origen fósil.

Sumario de la invención

20 La presente invención describe métodos y composiciones para producir productos de bioenergía o metabolitos. De manera más específica, la invención se refiere al uso de microorganismos particulares para producir productos de bioenergía o metabolitos a partir de biomasa o derivados de la misma. La invención procede entre otros del descubrimiento de que los microorganismos del género *Deinococcus* tienen propiedades inesperadas y ventajosas para la modificación o conversión de biomasa o derivados de biomasa con el propósito de obtener compuestos que se pueden usar para producir bioenergía, en particular etanol, a escala industrial y de manera económica y fiable.

El objetivo de la invención es como se define en las reivindicaciones.

30 La presente invención describe un método de producción de productos de bioenergía o metabolitos que comprende poner en contacto una biomasa o derivados de biomasa con una bacteria nativa o modificada que tiene la capacidad de reconstruir su genoma, completamente o parcialmente, cuando se fragmenta por un estrés, preferiblemente una bacteria nativa o modificada del género *Deinococcus*, o un extracto de la misma.

La invención describe además un método para convertir biomasa o derivados de biomasa en productos de bioenergía o metabolitos que comprende tratar dicha biomasa o derivados de biomasa en presencia de una bacteria del género *Deinococcus* o una bacteria que tiene la capacidad de reconstruir su genoma, completamente o parcialmente, cuando se fragmenta por un estrés, o un extracto de la misma.

35 En un aspecto particular, la presente invención describe un método que comprende las etapas siguientes:

- a) cultivar y/o hacer crecer dicha bacteria en condiciones aerobias y/o anaerobias,
- b) modificar una biomasa o derivados de biomasa hasta productos de bioenergía o metabolitos de interés industrial (p.ej., fuentes de bioenergía tales como etanol, bloques de construcción químicos tales como ácido succínico) mediante el uso de una composición que comprende dicha bacteria o un extracto de la misma, y
- 40 c) recoger al menos un producto de bioenergía o metabolito resultante de dicha modificación de biomasa o derivados de biomasa.

Esta invención también describe el uso de una bacteria del género *Deinococcus* o un extracto de la misma para producir productos de bioenergía o metabolitos a partir de biomasa o derivados de biomasa.

45 La invención también describe una composición que comprende una bacteria *Deinococcus* y una biomasa o derivados de biomasa.

La invención también describe productos de bioenergía producidos mediante el uso de un método como se describió anteriormente.

50 El método o uso de la invención se puede llevar a cabo mediante el uso de diversas especies de *Deinococcus* nativas o modificadas, tales como, sin limitación, *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus murrayi* o *Deinococcus cellulolyticus*. La presente invención demuestra que las bacterias *Deinococcus* pueden

favorecer de manera eficaz la producción de biocombustibles, tales como etanol, propanol, butanol, glicerol, butanodiol, propanodiol, o ácidos orgánicos de interés químico y sus sales, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido butírico, ácido láctico y/o ácido succínico o ésteres, en particular ésteres formados entre los alcoholes y los ácidos anteriormente mencionados.

5 La invención también demuestra de forma inesperada que *Deinococcus* se puede hacer funcionar en condiciones, tales como temperaturas elevadas, un intervalo amplio de pH, presencia de disolventes, presencia de sustratos en bruto, adecuadas para producir cantidades elevadas de productos de bioenergía o metabolitos a partir de diversos sustratos.

10 La invención describe así métodos nuevos y composiciones para producir productos de bioenergía o metabolitos de una manera muy eficaz.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Efecto bactericida del etanol sobre *Deinococcus geothermalis* DSM11301 en la fase de crecimiento exponencial: el potencial bactericida del etanol es significativo para un contenido mayor del 8,2% en la fase de crecimiento exponencial.

15 Figura 2: Efecto bactericida del etanol sobre *Deinococcus geothermalis* DSM11301 en la fase estacionaria: el potencial bactericida del etanol es significativo para un contenido mayor del 11,7% en la fase estacionaria.

Figura 3: Efecto bactericida del butanol sobre *Deinococcus geothermalis* DSM11300 en la fase de crecimiento exponencial: el potencial bactericida del butanol es significativo para un contenido mayor del 1,5% en la fase exponencial.

20 Figura 4: Efecto bactericida del butanol sobre *Deinococcus geothermalis* DSM11300 en la fase estacionaria: el potencial bactericida del butanol es significativo para un contenido mayor del 2% en la fase estacionaria.

Figura 5: Efecto del etanol sobre el crecimiento de *Deinococcus geothermalis* DSM11300: cuadrado negro, 0% de etanol; cuadrado blanco, 0,8% de etanol; círculo negro, 1,2% de etanol; círculo blanco, 2,4% de etanol; triángulo negro, 3,1% de etanol.

25 Figura 6A: Efecto del pH sobre el crecimiento de *D. geothermalis* DSM 113000 (DRH05): cuadrado negro, pH 8; círculo negro, pH 7; cuadrado blanco, pH 6; círculo blanco, pH 5; rombo negro, pH 4.

Figura 6B: Efecto del pH sobre el crecimiento de *D. geothermalis* HAMB1 2481 (DRH37): cuadrado negro, pH 8; círculo negro, pH 7; cuadrado blanco, pH 6; círculo blanco, pH 5; rombo negro, pH 4.

30 Figura 6C: Efecto del pH sobre el crecimiento de *D. geothermalis* HAMB1 2480 (DRH38): cuadrado negro, pH 8; círculo negro, pH 7; cuadrado blanco, pH 6; círculo blanco, pH 5; rombo negro, pH 4.

Figura 6D: Efecto del pH sobre el crecimiento de *D. geothermalis* HAMB1 2411 (DRH39): cuadrado negro, pH 8; círculo negro, pH 7; cuadrado blanco, pH 6; círculo blanco, pH 5; rombo negro, pH 4.

35 Figura 7: Crecimiento de *D. cellulosilyticus* en diferentes medios líquidos. Las bacterias se cultivaron como se describe en los materiales y métodos del ejemplo 9. Círculo negro, crecimiento en medio rico; cuadrado negro, crecimiento en medio mínimo que contiene CM-celulosa; cuadrado blanco, crecimiento en medio mínimo desprovisto de la fuente de carbono.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención describe métodos para la producción de productos de bioenergía o metabolitos mediante el uso de bacterias *Deinococcus*. La invención demuestra de hecho que las bacterias *Deinococcus* pueden producir productos de bioenergía o metabolitos a partir de biomasa, de una manera muy eficaz.

Definiciones

En el contexto de la presente solicitud, la expresión "bacterias del género *Deinococcus*" incluye las cepas de tipo natural o las variantes naturales de *Deinococcus* así como las cepas recombinantes, las cepas obtenidas por medio de técnicas de reordenamiento aleatorio del ADN o por medio de técnicas de evolución dirigida.

45 Un "extracto de una bacteria" designa cualquier fracción obtenida de una bacteria, tal como un sobrenadante celular, un resto celular, paredes celulares, extracto de ADN, enzimas o preparación de enzimas o cualquier preparación derivada de bacterias mediante tratamiento químico, físico y/o enzimático, que está básicamente exento de bacterias vivas.

50 En el contexto de la presente invención, el término "bioenergía" designa una energía renovable derivada de la biomasa. De manera más específica, la expresión "productos de bioenergía" designa "biocombustibles" y todos los

productos finales de la modificación de biomasa o derivados de biomasa que se pueden usar como combustibles, tales como etanol. El término "metabolitos" designa todas las moléculas intermedias posibles generadas durante la modificación de biomasa o derivados de biomasa hasta productos de bioenergía, que incluyen, pero sin limitación, varios productos químicos de interés industrial, tales como ácidos orgánicos y bloques de construcción.

5 En el contexto de la presente invención, el término "biomasa" se refiere al material biológico vivo y muerto recientemente que se puede usar como combustible o para la producción industrial. Lo más habitualmente, la biomasa se refiere a la materia vegetal cultivada para generar electricidad o para producir biocombustibles, pero también incluye la materia vegetal o animal usada para la producción de fibras, productos químicos o calor. La biomasa puede incluir también residuos biodegradables que se pueden quemar como combustible. El término
10 biomasa no incluye el material orgánico que se ha transformado mediante procesos geológicos hasta sustancias tales como carbón o petróleo.

La biomasa industrial se puede desarrollar a partir de numerosos tipos de plantas, que incluyen *Miscanthus*, pasto varilla, cáñamo, remolacha azucarera, trigo, maíz, chopo, sauce, sorgo, caña de azúcar, y una diversidad de especies de árboles, que varían de eucalipto a palma de aceite.

15 La biomasa según la invención comprende biomasa en bruto y/o biomasa secundaria. La biomasa en bruto es el material sin procesar de la materia biológica. Los ejemplos incluyen los productos de silvicultura, tales como árboles maduros inadecuados para producción de madera o papel, productos agrícolas, tales como hierba, cosechas y estiércol animal, y productos acuáticos, tales como algas. La biomasa secundaria es cualquier material derivado inicialmente de biomasa en bruto, que se ha sometido a cambios químicos y físicos considerables. Los ejemplos
20 incluyen papel, cuero, algodón, cáñamo, productos de caucho naturales, subproductos del procesamiento de alimentos, y aceites de cocina usados.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "derivados de biomasa" designa todas las moléculas derivadas de biomasa en bruto y/o de biomasa secundaria, como se definió anteriormente, y en particular cualquier material derivado inicialmente de biomasa en bruto, que se ha sometido a cambios químicos y físicos considerables,
25 tales como, por ejemplo, almidón, celulosa, hemicelulosas y lignina.

Tal como se usa en la presente memoria, las "plataformas intermedias" son moléculas obtenidas por medio de la transformación fisico-química o bioquímica de derivados de biomasa, tales como carbohidratos, almidón y gas de síntesis (sintegas) de origen biológico.

Descripción detallada

30 La presente invención propone usar bacterias *Deinococcus* para producir productos de bioenergía o metabolitos a partir de biomasa. La presente invención demuestra de hecho que las bacterias del género *Deinococcus* exhiben propiedades inesperadas que les permiten cooperar en la producción de productos de bioenergía o metabolitos, fermentando biomasa o derivados de biomasa.

35 Se ha demostrado que las bacterias *Deinococcus* tienen la capacidad de reconstruir su genoma, completamente o parcialmente, cuando se fragmenta por un estrés (documento PCT/EP2006/005826, Radman-Zahradka). Como se mencionó anteriormente, estas bacterias, en particular *D. radiodurans*, se han propuesto para la biorremediación. Sin embargo, nunca se ha descrito o propuesto que las bacterias *Deinococcus* fueran capaces de producir productos de bioenergía y metabolitos a partir de biomasa. Además, nunca se ha propuesto que las bacterias *Deinococcus* que tienen las propiedades biológicas necesarias se pudieran aislar y cultivar.

40 La invención demuestra ahora, por primera vez, que es posible aislar o cultivar bacterias *Deinococcus* que tienen al menos una de las propiedades siguientes, y que dichas bacterias son capaces de producir productos de bioenergía o metabolitos:

- es viable o funcional a temperaturas elevadas (p.ej., alrededor de 40-70 °C);
- es viable o funcional en un intervalo de pH de alrededor de 3 a alrededor de 9,5, preferiblemente entre
45 alrededor de 4 y alrededor de 8;
- es viable o funcional en presencia de agentes tóxicos, en disolventes orgánicos particulares, p.ej., etanol;
- es capaz de convertir carbohidratos C6 y C5;
- es capaz de favorecer la digestión de celulosa para producir glucosa;
- es capaz de favorecer la digestión de hemicelulosa para producir xilosa;
- 50 - es capaz de crecer en condiciones aerobias y/o anaerobias en presencia de una fuente de carbono adecuada.

Además, las bacterias *Deinococcus* en general están desprovistas de patogenicidad, y por lo tanto se pueden usar

sin un aislamiento específico.

La invención describe así, por primera vez, la capacidad de las bacterias *Deinococcus* de generar productos de bioenergía o metabolitos a partir de biomasa, así como su capacidad inesperada para el crecimiento y cultivo en condiciones específicas adaptadas a tal uso. La invención también describe el uso, para la producción de productos de bioenergía o metabolitos, de cualquier bacteria que tenga la capacidad de reconstruir su genoma, completamente o parcialmente, cuando se fragmenta por un estrés.

En una realización preferida, la invención usa una especie *Deinococcus* termófila, seleccionada preferiblemente de *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans* y *Deinococcus murrayi*.

En una realización preferida, la invención usa una bacteria *Deinococcus* viable en presencia de agentes tóxicos, en particular en presencia de disolventes orgánicos, por ejemplo etanol. La presente solicitud demuestra de hecho que las cepas de *Deinococcus* se pueden cultivar en presencia de niveles elevados de disolventes, tales como etanol o butanol, lo que permite la producción de biocombustibles de una manera más eficaz.

En otra realización preferida, la invención usa una bacteria que se puede cultivar en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 40 a 70 °C, preferiblemente de 50 °C a 60 °C. En una realización más preferida, la invención usa una bacteria que se puede cultivar a una temperatura elevada (por encima de 40 °C) y en presencia de un agente tóxico o disolvente orgánico, como se describió anteriormente.

En una realización particular adicional, la invención usa una bacteria *Deinococcus* que puede ser viable o funcional en condiciones de concentración de NaCl o sales equivalentes que alcanzan posiblemente alrededor del 5 % peso/volumen.

En otra realización preferida, la invención usa una bacteria que es viable en un intervalo de pH entre aproximadamente 3 y 9,5, preferiblemente entre 4 y 8. De hecho, los inventores han descubierto que las cepas de *Deinococcus* se pueden mantener en tales condiciones rigurosas, que son especialmente ventajosas para convertir la biomasa.

En una realización preferida, la invención usa una bacteria *Deinococcus* que es capaz de convertir carbohidratos C6 y/o C5 y/o favorecer la digestión de celulosa para generar glucosa y/o favorecer la digestión de hemicelulosa para generar xilosa.

En una realización particular, dicha bacteria *Deinococcus* es capaz de crecer en presencia de xilano y de favorecer la digestión de xilano.

Tales actividades enzimáticas, combinadas con una termorresistencia elevada, un intervalo amplio de tolerancia al pH y la tolerancia a agentes tóxicos, no se han informado antes y son notables. Como se demuestra en los ejemplos, las bacterias *Deinococcus* que tienen las propiedades anteriores se pueden aislar, cultivar, y producen cantidades sustanciales de productos de bioenergía o metabolitos a partir de biomasa.

A este respecto, otra ventaja de la invención reside en un uso, en el que dichas bacterias *Deinococcus* se cultivan en un medio mínimo que contiene carbohidratos C6, preferiblemente glucosa, o carbohidratos más complejos, preferiblemente sacarosa, celobiosa o almidón, o carbohidratos C5, preferiblemente xilosa, como fuente de carbono. Una ventaja adicional de la presente invención reside en el hecho de que dichas bacterias *Deinococcus* se pueden cultivar en presencia de carbohidratos C3, preferiblemente, glicerol o piruvato sódico.

Los ejemplos específicos de bacterias adecuadas para el uso en la presente invención son las cepas de *Deinococcus geothermalis* con los n°s de depósito DSM11300, DSM11301, DSM11302, HAMB12480, HAMB12481 y HAMB12411; cepas de *Deinococcus murrayi* con los n°s de depósito DSM11303 y DSM11305; o la cepa de *Deinococcus cellulolyticus* con el n° de depósito DSM18568^T (enumerada en la Tabla 1), o las cepas sustancialmente similares a las mismas o los mutantes de las mismas.

Tabla 1: Lista de cepas de *Deinococcus*

| Denominación | Género | Especie | Ref | Código | Temp °C | Referencia Bibliográfica |
|--------------|--------------------|---------------------|-----|--------|---------|---|
| DRH 05 | <i>Deinococcus</i> | <i>geothermalis</i> | DSM | 11300 | 45-50 | Ferreira et al, 1997 Int J Syst Bacteriol, 47(4):939-47 |
| DRH 06 | <i>Deinococcus</i> | <i>geothermalis</i> | DSM | 11301 | 45-50 | Ferreira et al, 1997 Int J Syst Bacteriol, 47(4):939-47 |

| Denominación | Género | Especie | Ref | Código | Temp °C | Referencia Bibliográfica |
|--------------|--------------------|-------------------------|--------|--------------------|---------|---|
| DRH 07 | <i>Deinococcus</i> | <i>geothermalis</i> | DSM | 11302 | 45-50 | Ferreira et al, 1997 Int J Syst Bacteriol, 47(4):939-47 |
| DRH 37 | <i>Deinococcus</i> | <i>geothermalis</i> | HAMB I | 2481 | 45-50 | Kolari et al, 2003 J Ind Microbiol Biotechnol, 30: 225-238 |
| DRH 38 | <i>Deinococcus</i> | <i>geothermalis</i> | HAMB I | 2480 | 45-50 | Kolari et al, 2003 J Ind Microbiol Biotechnol 30: 225-238 |
| DRH 39 | <i>Deinococcus</i> | <i>geothermalis</i> | HAMB I | 2411 | 45-50 | Väisänen et al, 1997, Applied Microbiology 84: 1069-1084 |
| DRH 08 | <i>Deinococcus</i> | <i>murrayi</i> | DSM | 11303 | 45-50 | Ferreira et al, 1997 Int J Syst Bacteriol, 47(4):939-47 |
| DRH 10 | <i>Deinococcus</i> | <i>murrayi</i> | DSM | 11305 | 45-50 | Ferreira et al, 1997 Int J Syst Bacteriol, 47(4):939-47 |
| DRH 46 | <i>Deinococcus</i> | <i>cellulosilyticus</i> | DSM | 18568 ^T | 45 | Weon et al, 2007, Int J of Syst & Evolutionary Microbiol, 57, 1685-1688 |

Todas las cepas enumeradas en la tabla anterior son capaces de crecer en un medio de cultivo de tipo PGY a pH 7. Otros medios de cultivo adecuados se describen en la sección experimental.

5 Se debería entender que las cepas adicionales de *Deinococcus* que tienen las propiedades actualmente demostradas y descubiertas pueden ser cribadas e identificadas por el técnico experto, basándose en las enseñanzas de la presente solicitud, p.ej., siguiendo la orientación y los ensayos descritos en la sección experimental.

10 Como se mencionó anteriormente, las cepas de *Deinococcus* usadas en la presente solicitud se pueden usar en forma nativa, o modificadas (p.ej., químicamente o genéticamente) para que adquieran propiedades mejoradas. A este respecto, en una realización particular, el método usa una bacteria *Deinococcus* que se modifica mediante evolución acelerada o mediante técnicas de reordenamiento aleatorio del ADN o mediante inserción de ADN eucariota, procariota o sintético que no es de *Deinococcus* o mediante inserción de ADN de otra cepa de *Deinococcus*, y dicha modificación afecta a la viabilidad, el crecimiento o las funciones de dicha bacteria para favorecer la modificación de biomasa.

15 En otra realización de la invención, la bacteria usada puede ser una cepa bacteriana recombinante o modificada, de manera ventajosa mediante el uso de un método tal como se describe en la solicitud de patente internacional N° PCT/EP2006/005826.

20 Como se discutió anteriormente, la invención demuestra que las bacterias del género *Deinococcus*, o los derivados de las mismas, seleccionadas, p.ej., entre *D. geothermalis*, *D. radiodurans* o *D. murrayi*, exhiben propiedades ventajosas y son capaces de producir productos de bioenergía o metabolitos a partir de diversos sustratos en bruto. La presente invención describe por lo tanto el uso de bacterias del género *Deinococcus* para la producción de productos de bioenergía o metabolitos a partir de biomasa o derivados de biomasa. La presente invención también describe un método para producir productos de bioenergía o metabolitos a partir de biomasa o derivados de biomasa exponiendo o cultivando dicha biomasa en presencia de bacterias del género *Deinococcus*, o un extracto de las mismas, y recuperando el producto de bioenergía o metabolito producido.

30 El cultivo o la exposición se pueden hacer en cualquier condición o medio adecuado que permita la modificación de la biomasa o derivado para producir un producto de bioenergía. A este respecto, el método se puede llevar a cabo en un reactor, en un fermentador, en el exterior, en presencia de nutrientes o aditivos adecuados, si es necesario. El método se lleva a cabo en general en condiciones de pH, temperatura por encima de 40 °C, y en presencia de sustratos adecuados.

Un objetivo particular descrito en la presente memoria reside en un método que comprende las etapas siguientes:

- a) cultivar y/o hacer crecer dicha *bacteria* en condiciones aerobias y/o anaerobias,
 - b) modificar (p.ej., convertir o tratar) biomasa o derivados de biomasa hasta productos de bioenergía o metabolitos mediante el uso de una composición que comprende dicha *bacteria* o un extracto de la misma,
- 35 y

- c) recoger al menos un producto de bioenergía o metabolito resultante de dicha modificación de biomasa o derivados de biomasa.

Otro objetivo descrito en la presente memoria reside en un método para convertir biomasa o derivados de biomasa mediante el uso de al menos una bacteria o extracto bacteriano tal como se definió anteriormente o una composición tal como se describió anteriormente, que comprende una combinación de:

- al menos una operación de colocación en cultivo y desarrollo de dicha cepa bacteriana o dicho extracto de cepa bacteriana en condiciones adecuadas de crecimiento y desarrollo,
- al menos una operación para convertir biomasa o un derivado de biomasa bajo la acción de cantidades adecuadas de dicha cepa bacteriana o dicho extracto de cepa bacteriana, en condiciones adecuadas para dicha conversión de biomasa, o derivados de biomasa, y
- recoger al menos un producto de bioenergía o metabolito derivado de dicha conversión de biomasa o derivado de biomasa, en particular recoger el etanol así producido.

En los métodos anteriores, la primera etapa de cultivar y/o hacer crecer dicha bacteria y la segunda etapa de modificar biomasa o derivados de biomasa hasta productos de bioenergía o metabolitos mediante el uso de una composición que comprende dicha bacteria o un extracto de la misma, se puede llevar a cabo de manera simultánea o de manera secuencial; la tercera etapa de recoger los productos de bioenergía o metabolitos se puede llevar a cabo de manera simultánea con la primera y/o la segunda etapa, o de manera secuencial. A este respecto, la biomasa se puede poner en contacto con la bacteria en condiciones adecuadas para permitir la expansión de dicha bacteria, por lo que se incrementa la eficacia del proceso. De manera alternativa, las cepas bacterianas se pueden expandir por separado, en condiciones de cultivo adecuadas, y posteriormente añadirlas a la biomasa. Se debería entender que las cantidades precisas de bacterias usadas inicialmente para transformar de manera eficaz la biomasa hasta productos de bioenergía sustanciales o metabolitos pueden ser ajustadas por el técnico experto dependiendo del tipo de bacterias, el tipo de biomasa o derivados, y las condiciones de cultivo.

En una realización particular del método descrito en la presente memoria, las bacterias *Deinococcus* se cultivan por separado de la conversión de biomasa.

En otra realización particular, el método usa una composición que comprende una bacteria *Deinococcus* o un extracto de la misma y al menos un aditivo o excipiente adecuado, preferiblemente al menos un agente elegido del grupo que consiste en agentes antiespumantes y agentes nutritivos. Los agentes antiespumantes adecuados son dispersantes, detergentes y tensioactivos en particular, y más en general compuestos anfifílicos.

En una realización particular, el método descrito en la presente memoria se lleva a cabo en un reactor de conversión de biomasa. "Reactor" significa un tanque de fermentación convencional o cualquier aparato o sistema para la conversión de biomasa diseñado especialmente para implementar la invención, y que por lo tanto consiste en particular en biorreactores, biofiltros, contactores biológicos rotatorios, y otros biorreactores de fase gaseosa y/o líquida para el tratamiento de biomasa o derivados de biomasa. El aparato que se puede usar según la invención se puede usar de manera continua o por cargas.

En el reactor, para implementar el uso de la invención, se usa al menos una bacteria o extracto bacteriano de la invención, y/o al menos una composición tal como se definió anteriormente, a la vez que dicho reactor se adapta y se suministra de manera que se ajustan y se mantienen las condiciones fisicoquímicas en él de manera que dicha bacteria es funcional para la aplicación considerada y de manera que, opcionalmente, es posible el crecimiento bacteriano y preferiblemente se favorece en él.

En otra realización descrita en la presente memoria, las bacterias se cultivan en un reactor, durante la conversión de biomasa o derivados de biomasa, a la vez que se ajustan y se mantienen las condiciones fisicoquímicas adecuadas para que este crecimiento bacteriano sea posible, y preferiblemente se favorezca. Por ejemplo, se puede usar un Erlenmeyer de 500 ml en presencia de 100 ml de medio 167 Thermus o el medio mínimo descrito más adelante a una temperatura de 50 °C.

En las realizaciones alternativas, la conversión de biomasa o derivados de biomasa se lleva a cabo en aerobiosis, anaerobiosis o en microaerobiosis.

Según un aspecto adicional, se describe un reactor para la conversión de biomasa o derivados de biomasa, mediante el uso de al menos una bacteria *Deinococcus* o extracto bacteriano tal como se definió anteriormente, o una composición tal como se definió anteriormente.

El proceso descrito en la presente memoria se puede usar para producir bioenergía a partir de diversos tipos de biomasa. En una realización preferida, la biomasa comprende madera y residuos de madera, residuos forestales, residuos de fábricas de papel, cosechas agrícolas, residuos agrícolas, plantas comestibles y/o no comestibles o partes de las mismas, paja, residuos de jardines, plantas acuáticas, residuos animales, residuos de operaciones con ganado, estiércol, residuos orgánicos municipales y/o residuos orgánicos industriales. La biomasa puede incluir

también residuos biodegradables.

5 En una realización particular, se describe un método para modificar biomasa o derivados de biomasa o plataformas intermedias hasta productos de bioenergía o metabolitos, en el que los derivados de biomasa son preferiblemente lignina, celulosa, hemicelulosa, almidón, y en el que las plataformas intermedias son preferiblemente carbohidratos, tales como xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano, xiloglucano, almidón, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y/o fructosa.

10 Un objetivo particular descrito en la presente memoria reside en un método para la producción de biocombustibles. En el contexto de la presente invención, el término "biocombustible" designa un combustible derivado de una fuente de carbono biológica viva o recientemente muerta. El biocombustible se puede producir a partir de recursos renovables, en especial biomasa vegetal o animal, o de residuos municipales e industriales. El biocombustible según la invención comprende "biocombustible de primera generación" y/o "biocombustible de segunda generación".

15 Los biocombustibles de primera generación se obtienen a partir de material orgánico vegetal o animal, preferiblemente a partir de carbohidratos, almidón, aceite vegetal o grasas animales. La fuente principal para la producción de biocombustibles de primera generación son las plantas comestibles o partes de las mismas. Los biocombustibles de primera generación incluyen aceite vegetal, biodiésel, bioalcoholes, biogas, sintegas y biocombustibles sólidos. Los bioalcoholes incluyen etanol, propanol y butanol. Más preferiblemente, el método descrito se usa para la producción de etanol, propanol, butanol. El biocombustible más preferido es etanol.

20 Los biocombustibles de segunda generación se producen preferiblemente a partir de plantas no comestibles o partes de plantas no comestibles. Estos incluyen cosechas que no son alimentarias, residuos de biomasa, tallos de trigo, maíz y madera. Preferiblemente, el biocombustible según la invención incluye los biocombustibles celulósicos.

25 Dependiendo de la biomasa de partida, la producción de productos de bioenergía o metabolitos, tales como biocombustible, puede requerir dos etapas sucesivas: una etapa de hidrólisis, catalizada por enzimas, preferiblemente celulasas o lacasas, que rompen cadenas de carbohidratos largas y complejas, tales como celulosa o lignina, respectivamente, hasta carbohidratos fermentables más pequeños; y una etapa de fermentación, que rompe adicionalmente los compuestos orgánicos, tales como carbohidratos, hasta alcoholes. Se debería indicar que las cepas de *Deinococcus* según la presente invención se pueden usar para una o para las dos reacciones. De hecho, la invención demuestra que *Deinococcus* puede hidrolizar cadenas largas de carbohidratos (p.ej., xilano o celulosa) y puede producir también metabolitos (p.ej., etanol, glicerol, butanodiol, propanodiol, así como ácido acético, propiónico, pirúvico y butírico) a partir de carbohidratos C3, C5 o C6. Si se desea, sin embargo, se debería indicar que las cepas de *Deinococcus* se pueden usar en combinación con otras cepas bacterianas.

30 Los ejemplos siguientes se proporcionan con fines ilustrativos, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayos de selección

35 Para determinar si un microorganismo está provisto de las propiedades requeridas por la invención, se deben llevar a cabo ensayos específicos para determinar si un género, una especie y/o una cepa bacteriana es capaz de tener las propiedades requeridas y de funcionar en un método para la conversión de biomasa o derivados de biomasa, y para determinar qué mejoras significativas se pueden obtener de ese modo.

Estos ensayos específicos según la invención se llevan a cabo en las condiciones siguientes:

Medio de cultivo:

40 Se cultiva *D. geothermalis* (D.G.) a 50 °C con agitación, en un medio aerobio. Se usa el medio de cultivo 167 para mantener la cepa. Se usa medio mínimo en los experimentos de fermentación, en particular para caracterizar los metabolitos. En este caso, se incuban 500 ml de medio de cultivo de 1 a 7 días con agitación en un Erlenmeyer de 1 L, tras haberlo sembrado con 5 ml de cultivo confluyente de *D.G.*

Medio de cultivo 167

45

| | | |
|-------------------------|-----|----|
| Triptona | 1 | g |
| Extracto de levadura | 1 | g |
| Agar | 28 | g |
| Ácido nitrilotriacético | 100 | mg |

ES 2 426 390 T3

| | | |
|--|-----|----|
| CaSO ₄ x 2 H ₂ O | 40 | mg |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 200 | mg |
| Citrato de Fe 0,01 M | 0,5 | ml |
| Disolución de oligoelementos (véase más adelante) | 0,5 | ml |
| Tampón fosfato (véase más adelante) | 100 | ml |
| H ₂ O | 900 | ml |
| Ajustar a pH 7,2 con NaOH, tratar en autoclave a 121 °C durante 15 min. tratar en autoclave el tampón fosfato por separado y añadirlo al medio | | |

Tampón fosfato

| | | |
|--|------|----|
| KH ₂ PO ₄ | 5,44 | g |
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O | 43 | g |
| H ₂ O | 1000 | ml |
| Ajustar a pH 7,2 | | |

5

Disolución de oligoelementos:

| | | |
|---|-------|----|
| H ₂ SO ₄ | 0,5 | ml |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 2,28 | g |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,5 | g |
| H ₃ BO ₃ | 0,5 | g |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 25 | mg |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 25 | mg |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 45,00 | mg |
| H ₂ O | 1000 | ml |

Medio mínimo

Tampón MOPS

10

| | | |
|--------------------|-----|----|
| Ácido MOPS | 400 | mM |
| NH ₄ Cl | 200 | mM |
| NaOH | 100 | mM |
| KOH | 100 | mM |
| CaCl ₂ | 5 | M |

ES 2 426 390 T3

| | | |
|--------------------------------|------|----|
| K ₂ SO ₄ | 276 | mM |
| MgCl ₂ | 5.28 | mM |
| pH 7, filtrado, esterilizado | | |

Fuente de carbono

| | | |
|------------------------|-----|----|
| Glucosa | 160 | mM |
| Filtrado, esterilizado | | |

5

Fosfato

| | | |
|---------------------------------|------|----|
| K ₂ HPO ₄ | 12,3 | mM |
| KH ₂ PO ₄ | 7,7 | mM |
| Filtrado, esterilizado | | |

Vitaminas

| | | |
|--|----|----|
| D-biotina | 10 | μM |
| Niacina | 10 | μM |
| Piridoxal-HCl | 10 | μM |
| Tiamina-HCl | 10 | μM |
| Almacenar a pH 4, filtrado, esterilizado | | |

10

Disolución de oligoelementos

| | | |
|---|------|----|
| H ₂ SO ₄ | 5 | ml |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 22.8 | g |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 5 | g |
| H ₃ BO ₃ | 5 | g |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 250 | mg |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 250 | mg |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 450 | mg |
| H ₂ O | 1000 | ml |
| Filtrado, esterilizado | | |

Fuente de hierro

| | | |
|------------------------|-----|---|
| FeCl ₃ | 200 | M |
| Citrato sódico | 200 | M |
| Filtrado, esterilizado | | |

Aminoácidos

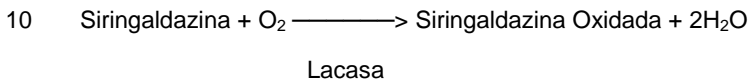
5

| | | |
|------------------------|-----|----|
| Ser | 100 | mM |
| Gln | 100 | mM |
| Filtrado, esterilizado | | |

Estas disoluciones de almacenamiento en el estado concentrado 10X se diluyen en el momento del uso.

Detección de la actividad lacasa de la bacteria

Principio:



Reactivos:

- A. Tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 6,5 a 30 °C
- 15 B. Siringaldazina 0,216 mM (se preparan 3 ml en etanol absoluto de Siringaldazina obtenida de Sigma Prod., N° S-7896.)
- C. Enzima

| | ensayo | blanco |
|------------------|-------------------------------------|--|
| H ₂ O | 0,50 ml | Medio no fermentado, 0,5 ml o dilución |
| Reactivo A | 2,20 ml | 2,20 ml |
| Reactivo B | 0,3 ml | 0,3 ml |
| Reactivo C | Medio fermentado, 0,5 ml o dilución | 0 |

Se registra el incremento de densidad óptica a 530 nm.

- 20 En estas condiciones, una unidad de enzima produce un incremento de densidad óptica de 0,001 por minuto a pH 6,5 y a 30 °C.

Detección de la actividad celulasa de la bacteria:

Principio:

- 25 El ensayo se basa en el seguimiento de la conversión de NAD hasta NADH durante la degradación de la celulosa. Después se monitoriza el incremento de la absorbancia a 340 nm siguiendo las instrucciones del proveedor, disponibles en el enlace de Internet:

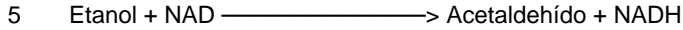
(<http://www.sigmaldrich.com/img/assets/18160/Cellulase.pdf>)

Detección de la producción de etanol:

El etanol se cuantifica mediante el uso de dos métodos.

Método enzimático:

ADH



Este método se basa en el seguimiento de la conversión de NAD hasta NADH en presencia de etanol y alcohol deshidrogenasa.

Esta reacción se traduce como un incremento de la absorbancia a 340 nm. Para esta medida, se usó el equipo Sigma N7160 siguiendo las instrucciones del fabricante disponibles en el enlace de Internet:

10 (<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/N7160BUL.pdf>).

Medida mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa.

Condiciones:

HPLC Gilson con inyector automático, detección mediante refractometría,

Columna: Phenomenex Rezex ROA, 300 mm x 7,8 mm

15 Temperatura de la columna: 65 °C

Fase móvil: ácido sulfúrico 0,005 N

Caudal: 0,600 ml/min

20 Primero se hace una curva de calibración inyectando medio de cultivo que contiene concentraciones conocidas de etanol en la columna. Se mide el área del pico eluido a los 22,26 min que corresponde a etanol. Se traza una curva de calibración.

A continuación, se mide la cantidad de etanol producida por la bacteria inyectando el sobrenadante del cultivo en la columna. Se mide el área del pico eluido a los 22,26 min y que corresponde a etanol. La concentración de etanol presente en el sobrenadante se deduce mediante la comparación con la curva de calibración.

25 La detección y cuantificación de los otros metabolitos posiblemente producidos en diversas proporciones se puede hacer siguiendo métodos convencionales de análisis y estudio.

Las bacterias son organismos haploides que se reproducen mediante división binaria y que se alimentan de sustancias minerales y orgánicas que se hallan en el medio.

30 Sus necesidades de gases, en especial con respecto al oxígeno, son variadas, y las técnicas de cultivo y fermentación a usar se deben adaptar a si son aerobias estrictas, anaerobias estrictas o microorganismos aero-anaerobios facultativos.

La actividad de la celulasa, requerida de manera ventajosa por la invención, participa en la degradación de celulosa, mientras la actividad de lacasa permite o facilita la degradación de lignina.

35 La producción, desde la fermentación de biomasa, de productos de bioenergía tales como etanol en particular y/u otros metabolitos se lleva a cabo siguiendo las condiciones de funcionamiento que se adaptan después de ensayos iterativos a las condiciones y parámetros de la técnica de la presente invención, que son, en particular, las cantidades de medio de cultivo bacteriano, las condiciones de funcionamiento de temperatura y/o presión, y las opciones de fermentación aerobia, anaerobia o microaerobia.

Siguiendo los ensayos específicos y ensayos descritos anteriormente, las cepas naturales o modificadas genéticamente seleccionadas se implementan según el método descrito.

40 Ejemplo 2: Producción de etanol en presencia de *Deinococcus geothermalis*

En un Erlenmeyer de 500 ml, que contiene 100 ml de medio mínimo a 50 °C, se añade un inóculo de 10¹⁰ *D. geothermalis* (DG) a 50 °C. El cultivo se coloca con agitación para favorecer la aireación.

Este cultivo está listo entonces para usarlo en un tanque de fermentación de biomasa convencional en el que, en las mejores condiciones, se puede obtener etanol y otros metabolitos con un rendimiento excelente a 55 °C.

45 Después de 1 a 7 días en el reactor con la biomasa a tratar, se cuantificó la presencia del etanol y los metabolitos

anteriormente mencionados mediante HPLC (siguiendo el protocolo descrito anteriormente). Se observó la desaparición de glucosa y la producción concomitante de etanol, cuya concentración se estimó analíticamente. Se detectaron otros metabolitos de interés. La sustitución de glucosa por xilosa en el medio de cultivo también permite el crecimiento bacteriano y la producción de etanol.

- 5 En una variante de la realización de este ejemplo, se pueden obtener resultados similares llevando a cabo tanto el cultivo bacteriano como la fermentación en el mismo tanque.

Ejemplo 3: Efecto bactericida del etanol y butanol sobre *Deinococcus geothermalis*

Materiales y métodos

- 10 Este método permite el estudio del efecto bactericida de los disolventes orgánicos sobre las bacterias en crecimiento o en la fase estacionaria. Los disolventes ensayados son etanol y butanol. Las bacterias ensayadas que pertenecen al género *Deinococcus*:

- se desarrollan entre 40 y 70 °C

- son funcionales entre pH 3 y pH 9,5

- 15 - son capaces de reconstruir, completamente o parcialmente, su genoma fragmentado por un estrés, en particular por irradiación, en particular rayos UV o rayos gamma, por desecación, por acción enzimática, por ultrasonidos o por estrés químico.

- 20 El ensayo se debe llevar a cabo a la temperatura óptima de crecimiento para la cepa ensayada. A partir de un pre-cultivo en fase estacionaria en un medio enriquecido, se siembran 10 ml de medio enriquecido a un 1 % v/v. El medio enriquecido contiene: 2 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de glucosa: disolución esterilizada mediante tratamiento en autoclave (20 minutos a 120 °C). A esta disolución se le añaden las disoluciones siguientes: tampón MOPS (10X) de pH 7 [ácido MOPS 400 mM, NH₄Cl 200 mM, NaOH 1000 mM, KOH 100 mM, CaCl₂ 5 μM, Na₂SO₄ 2,76 mM, MgCl₂ 5,28 mM]; micronutrientes (10000X) [(NH₄)₆(Mo₇)₂₄ 300 mM, H₃BO₃ 4 mM, CoCl₂ 0,3 mM, CUSO₄ 0,1 mM, MnCl₂ 2,5 mM, ZnSO₄ 0,1 mM]; FeCl₃ (100X) 20 mM en C₆H₅Na₃O₇ 20 mM; 1 g/l de K₂HPO₄: disoluciones esterilizadas mediante filtración (45 μm).

- 25 Se distribuyen 200 μl de cultivo en una microplaca de 96 pocillos. Para evitar cualquier fenómeno de evaporación del disolvente, la microplaca se cubre con una película estéril impermeable.

Una vez que se alcanza la fase de crecimiento exponencial (densidad óptica de 0,5 a 600 nm) o la fase estacionaria (meseta), se añade el disolvente. El contenido ensayado es del 0 al 31 % para etanol y 0 al 2,5 % para butanol. El cultivo se incuba después con agitación durante una hora.

- 30 Recuento: Al final de la incubación, y para cada concentración en el disolvente, se transfieren 20 μl de cultivo a otra microplaca y se diluyen en cascada (diluciones a 1/10 a lo largo de 9 pocillos). El medio de cultivo de dilución es un medio enriquecido. Se extienden 5 μl de cada dilución por triplicado en medio PGY agar, 5 g/l de peptona, 2,5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de glucosa, 14 g/l de agar: medio esterilizado mediante autoclave 20 minutos a 120 °C. Una vez que el crecimiento lo permite, para cada porcentaje de disolvente ensayado, se lleva a cabo un recuento para estudiar la influencia de los disolventes orgánicos sobre la cepa.

Resultados

La concentración de disolvente a la que se considera que existe una pérdida de viabilidad bacteriana corresponde a la concentración mínima de disolvente a la que se observa la pérdida de una unidad logarítmica con respecto al control.

- 40 Las cepas ensayadas (Figuras 1 a 4) presentan una resistencia satisfactoria a los disolventes desde el punto de vista de una aplicación industrial en un fermentador.

Ejemplo 4: Crecimiento de bacterias en presencia de fuentes de carbono C3, C5 y C6

Materiales y métodos

- 45 Los pre-cultivos se llevaron a cabo en medio A que contenía peptona (2 g/l), extracto de levadura (5 g/l), glucosa (10 g/l) o en medio PGY. Tras la centrifugación del medio de cultivo, el sedimento bacteriano se lavó dos veces con medio mínimo A para eliminar todas las fuentes de nutrientes en el inóculo. Este inóculo se usó para sembrar (1/66) el medio de cultivo A (200 μl) que contenía una de las siguientes fuentes de carbono al 1 % (p/v): D(+)-glucosa, D(+)-celobiosa, sacarosa, almidón, D(+)-xilosa, xilano de madera de abedul, glicerol, piruvato sódico. En el caso de las cepas DRH07, DRH39, DRH08 y DRH10, se añadió glutamato (10 mM) al medio de cultivo. El crecimiento bacteriano se llevó a cabo a 45 °C en microplacas de 96 pocillos con agitación y después se midió la densidad óptica a 544 nm mediante el uso de un espectrofotómetro (plataforma de detección multimarcador para placas Chameleon, ScienceTec) o a 600 nm mediante el uso de un lector de microplacas Spectrostar OMEGA (BMG Labtech).

Referencias de las fuentes de carbono usadas: Xilano de madera de abedul (95588, Fluka), celobiosa (22150, Fluka), D(+)-xilosa (95730, Fluka), glucosa (G8270-1KG, Sigma), sacarosa (S9378-1KG, Sigma), almidón (S9765-500G, Sigma), glicerol (453752, CarloErba), piruvato sódico (Sigma).

Composición y preparación de los medios de cultivo

5 Medio PGY: Peptona (10 g/l), glucosa (1 g/l), extracto de levadura (5 g/l), la mezcla se trata en autoclave durante 20 minutos a 120 °C.

Medio A: Las diversas disoluciones usadas para preparar el medio A se prepararon a partir de una disolución de reserva esterilizada mediante filtración:

10 - Una disolución (pH 7) que contiene: tampón de ácido MOPS 40 mM, NH₄Cl 20 mM, KOH 10 mM, NaOH 10 mM, CaCl₂ 0,5 μM, Na₂SO₄ 0,276 mM, MgCl₂ 0,528 mM.

- Una disolución de micronutrientes (pH 5): (NH₄)₆(MO₇)₂₄ 3 nM, H₃BO₃ 400 nM, CoCl₂ 30 nM, CuSO₄ 10 nM, MnCl₂ 250 nM, ZnSO₄ 10 nM.

- Disolución de vitaminas, pH 4, (1 μg/l de cada una): D-biotina, niacina, piridoxal-HCl, tiamina-HCl, vitamina B12.

- Fuente de fosfato: K₂HPO₄ 5,7 mM.

15 - FeCl₃ 20 μM (preparada en una disolución de citrato sódico y después filtrada).

Resultados

20 Las bacterias enumeradas en la Tabla 2 (más adelante) son capaces de multiplicarse en un medio de cultivo mínimo (medio A) que contiene, como única fuente de carbono, carbohidrato C6 tal como glucosa, sacarosa, celobiosa y almidón. Se debería indicar que las cepas DRH37 y DRH06 también son capaces de crecer en presencia de glicerol y piruvato sódico (carbohidratos C3).

Las bacterias enumeradas en la Tabla 3 también son capaces de multiplicarse en un medio de cultivo mínimo que contiene carbohidratos C5 (xilosa o xilano) como única fuente de carbono; con la excepción de las cepas DRH06 y DRH07 que no son capaces de crecer en presencia de xilano y xilosa, respectivamente.

25 Tabla 2: Ensayo de asimilación de diversas fuentes de carbono C6 y C3 llevado a cabo con diversas especies de *D. geothermalis* y *D. murrayi*: - ΔDO < 0,2; + ΔDO = 0,2; ++ 0,3 ≥ ΔDO > 0,4; +++ 0,4 ≥ ΔDO ≥ 0,5; ++++ ΔDO ≥ 0,6. ΔDO corresponde a la diferencia entre el valor de DO a 544 nm en el tiempo inicial T0 del crecimiento y en el tiempo T196 horas (aproximadamente 8 días).

| Fuentes de carbono al 1% (p/v) | <i>D. geothermalis</i> | | | | | <i>D. murrayi</i> | | |
|--------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-------|-------|
| | DRH05 | DRH06 | DRH07 | DRH37 | DRH38 | DRH39 | DRH08 | DRH10 |
| Carbohidratos C6: | | | | | | | | |
| D-(+)-glucosa | +++ | + | ++ | ++ | +++ | +++ | + | + |
| D-(+)-celobiosa | ++ | - | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | - |
| Sacarosa | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | - |
| Almidón | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | - | ++ | - |
| Carbohidratos C3: | | | | | | | | |
| Glicerol | - | - | - | ++ | - | - | - | - |
| Piruvato sódico | - | + | - | - | - | - | - | - |

30 Tabla 3: Ensayo de asimilación de diversas fuentes de carbono C5 y C6 llevado a cabo con diversas especies de *D. geothermalis* - ΔOD < 0,2; + ΔDO = 0,2; ++ 0,3 ≥ Δ DO > 0,4; +++ 0,4 ≥ Δ DO ≥ 0,5; ++++ Δ DO ≥ 0,6. Δ DO corresponde a la diferencia entre el valor de la DO a 600 nm en el tiempo inicial T0 del crecimiento y en el tiempo T64 horas (aproximadamente 2,5 días).

| Fuente de carbono 1% (p/v) | DRH05 | DRH06 | DRH07 | DRH37 | DRH38 | DRH39 |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| D-(+)-glucosa | +++ | ++ | + | ++++ | +++ | +++ |
| Xilano | +++ | - | + | ++++ | ++++ | ++++ |
| Xilosa | +++ | +++ | - | ++++ | +++ | + |

Ejemplo 5: Crecimiento de bacterias en una concentración elevada de etanol

Materiales y métodos

5 Este método permite el estudio de la capacidad de un microorganismo de desarrollarse en presencia de una concentración elevada de etanol. Las bacterias ensayadas que pertenecen a la especie *Deinococcus geothermalis*:

- se desarrollan entre 40 y 70 °C,

- son funcionales entre pH 3 y pH 9,5,

10 - son capaces de reconstruir, parcialmente o completamente, su genoma fragmentado por un estrés, en particular por irradiación, en particular rayos UV o rayos gamma, por desecación, por acción enzimática, por ultrasonidos o por estrés químico.

15 El ensayo se debe llevar a cabo a la temperatura óptima de crecimiento para la cepa ensayada. A partir de un pre-cultivo en fase estacionaria en un medio de cultivo enriquecido, para cada contenido de etanol a ensayar, se siembran 20 ml de medio enriquecido al 1 % v/v. El medio de cultivo enriquecido contiene: 2 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de glucosa: disolución esterilizada mediante tratamiento en autoclave (20 minutos a 120 °C). A esta disolución se le añaden las disoluciones siguientes: tampón MOPS (10X) de pH 7 [tampón de ácido MOPS 400 mM, NH₄Cl 200 mM, NaOH 1000 mM, KOH 100 mM, CaCl₂ 5 μM, Na₂SO₄ 2,76 mM, MgCl₂ 5,28 mM]; micronutrientes (10000X) [(NH₄)₆(MoO₇)₂₄ 300 mM, H₃BO₃ 4 mM, CoCl₂ 0,3 mM, CUSO₄ 0,1 mM, MnCl₂ 2,5 mM, ZnSO₄ 0,1 mM]; FeCl₃ (100X) 20 mM en C₆H₅Na₃O₇ 20 mM; 1 g/l de K₂HPO₄: disoluciones esterilizadas mediante filtración (45 μm).

20 Se añade etanol a T0, el contenido varía del 0 al 31%. Se lleva a cabo un seguimiento del crecimiento para cada contenido de etanol ensayado. Se lee la DO a 600 nm mediante el uso de un espectrofotómetro (UV Light XS5, SECOMAM). Se toma una alícuota de 1 ml del cultivo en los tiempos: T0, T0+1H, T0+3H, T0+18H, T0+20H, T0+22H, T0+24H.

25 Cuando sea necesario para la lectura, el cultivo se diluye a un décimo en medio enriquecido. Se pueden dibujar curvas de crecimiento para cada contenido de etanol ensayado. Al final del periodo de incubación y para cada contenido de etanol ensayado, se realiza un recuento para determinar la influencia del etanol sobre la cepa.

Resultados

30 Algunas cepas ensayadas, tales como *Deinococcus geothermalis* DSM11300, son capaces de crecer en un medio de cultivo que contiene etanol (véase la Figura 5). Algunas cepas, tales como *Deinococcus geothermalis* DSM11300, muestran resistencia en los medios de cultivo con un contenido elevado de etanol (véase la Figura 6A).

Ejemplo 6: Producción de metabolitos de interés por *Deinococcus murrayi*

Materiales y métodos

35 Este método permite el estudio de la capacidad de un microorganismo de producir metabolitos de interés (del grupo que consiste en glicerol, butanodiol, propanodiol, y ácido acético, propiónico, pirúvico y butírico) a partir de biomasa o un derivado de biomasa.

Las bacterias ensayadas que pertenecen a la especie *Deinococcus geothermalis*:

- se desarrollan entre 40 y 70 °C,

- son funcionales entre pH 3 y pH 9,5,

40 - son capaces de reconstruir, parcialmente o completamente, su genoma fragmentado por un estrés, en particular por irradiación, en particular rayos UV o rayos gamma, por desecación, por acción enzimática, por ultrasonidos o por estrés químico.

El ensayo se debe llevar a cabo a la temperatura óptima de crecimiento para la cepa ensayada. A partir de un pre-cultivo (en fase estacionaria) preparado en un medio de cultivo enriquecido, se siembran 20 ml de medio

enriquecido: siembra al 1 % v/v.

5 El medio de cultivo enriquecido contiene: 2 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de glucosa: disolución esterilizada mediante tratamiento en autoclave (20 minutos a 120 °C). A esta disolución se le añaden las disoluciones siguientes: disolución tampón MOPS (10X) de pH 7 [ácido MOPS 400 mM, NH₄Cl 200 mM, NaOH 1000 mM, KOH 100 mM, CaCl₂ 5 μM, Na₂SO₄ 2,76 mM, MgCl₂ 5,28 mM]; micronutrientes (10000X) [(NH₄)₆(Mo₇)₂₄ 300 mM, H₃BO₃ 4 mM, CoCl₂ 0,3 mM, CuSO₄ 0,1 mM, MnCl₂ 2,5 mM, ZnSO₄ 0,1 mM]; FeCl₃ (100X) 20 mM en C₆H₅Na₃O₇ 20 mM; 1 g/l de K₂HPO₄: disoluciones esterilizadas mediante filtración (45 μm).

10 El cultivo se deja en un incubador, a 45 °C, con agitación, hasta que alcanza su fase estacionaria. Una vez que se alcanza la fase estacionaria, el cultivo se centrifuga durante 10 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se vierte en otro tubo y se coloca a -80 °C. Un análisis mediante HPLC UV y refractometría (columna de intercambio iónico (H+)Biorad, fase móvil H₂SO₄ 5 mM, caudal de la fase móvil 0,6 ml/min, modo isocrático) permite identificar los metabolitos de interés.

Resultados

Ciertas cepas ensayadas producen algunos de los metabolitos de interés deseados (Tabla 4).

15 Tabla 4: Metabolitos producidos por *Deinococcus murrayi* DSM11305 (expresados en g/l).

| | GLUCOSA | ÁCIDO ACÉTICO | ÁCIDO PROPIÓNICO | ÁCIDO PIRÚVICO |
|----------|---------|---------------|------------------|----------------|
| DRH10 CM | 7,76 | 0,138 | 1,044 | 0,043 |

Ejemplo 7: Crecimiento de *Deinococcus geothermalis* en diversas condiciones de pH

Materiales y métodos

20 Las cepas se cultivan a 45 °C en medio PGY a diferentes pHs. El pH se ajustó con NH₃ del 10 % (v/v) o HCl 10 N. El crecimiento se sigue midiendo la densidad óptica a 600 nm mediante el uso de un lector de microplacas Spectrostar de OMEGA, BMG Labtech.

Resultado

25 Cuatro cepas (*D. geothermalis*) fueron capaces de multiplicarse en un intervalo de pH entre 5 y 8 (véanse las Figuras 6A, 6B, 6C y 6D).

Ejemplo 8: Aislamiento de bacterias termófilas resistentes a luz UV a partir de un medio natural

Tratamiento de muestras de agua caliente

30 Las muestras de agua caliente se concentran mediante filtración a través de un filtro de nitrocelulosa de 0,22 μm (Millipore, Francia) y después se colocan en suspensión en 10 ml de agua estéril. La disolución filtrada se somete después a sonicación durante aproximadamente 60 segundos para resuspender las bacterias.

Tratamiento de muestras de madera y guijarros

Las muestras de madera y guijarros se sumergen en agua estéril y después se agitan en vórtex y se someten a sonicación durante aproximadamente 60 segundos.

Tratamiento de muestras de piedras, musgo, líquen, lodo, sedimento, biopelícula, tierra y excremento animal

35 Las muestras de musgo, líquen, lodo, tierra y excremento animal se colocan en suspensión en agua estéril (VN) y después se agitan en vórtex. Las muestras se someten después a sonicación durante aproximadamente 60 segundos.

Aislamiento de las bacterias termófilas resistentes a luz UV

40 Tras la sonicación, entre 500 μl y 2 ml, las suspensiones se extienden sobre un medio de cultivo enriquecido PGY-agar sólido esterilizado mediante tratamiento en autoclave (20 minutos a 120 °C) que contiene 1 g/l de glucosa (Sigma-Aldrich, Francia), 10 g/l de peptona (Fluka, Francia) y 5 g/l de extracto de levadura (Fluka, Francia). El medio de cultivo sembrado se somete después a 3 tratamientos UV mediante el uso de un aparato BLX-E254 Biolink (Vilber-Lourmat, Francia) de 4 mJ/cm² cada uno llevados a cabo en un intervalo de 4 horas. Tras una incubación a 45 °C durante 3 a 4 días, las colonias termófilas de interés son visibles.

Ejemplo 9: Digestión de celulosa con *Deinococcus cellulosilyticus*

Materiales y métodos

5 Se llevó a cabo un pre-cultivo de la cepa *D. cellulosilyticus* en un medio enriquecido (véase la composición más adelante). Este pre-cultivo se usa para sembrar (1 % v/v) 10 ml de medio enriquecido, de medio mínimo que contiene carboximetil celulosa (CM-celulosa), o este mismo medio desprovisto de la fuente de carbono.

El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo a 30 °C en tubos Falcon de 50 ml con agitación (110 rpm) y se siguió midiendo la densidad óptica a 600 nm con un espectrofotómetro (WPA Biowave, Medidor de Densidad Celular).

10 Medio enriquecido: 2 g/l de peptona; 5 g/l de extracto de levadura; 10 g/l de glucosa; una disolución (pH 7) que contiene: ácido MOPS 40 mM, NH₄Cl 20 mM, KOH 10 mM, NaOH 10 mM, CaCl₂ 0,5 μM, Na₂SO₄ 0,276 mM, MgCl₂ 0,528 mM; una disolución de micronutrientes (pH 5): (NH₄)₆(Mo₇)₂₄ 3 nM, H₃BO₃ 400 nM, CoCl₂ 30 nM, CuSO₄ 10 nM, MnCl₂ 250 nM, ZnSO₄ 10 nM; una disolución de vitaminas, pH 4, (1 μg/l cada una): D-biotina, niacina, piridoxal-HCl, tiamina-HCl, vitamina B12; una fuente de fosfato: K₂HPO₄ 5,7 mM; FeCl₃ 20 μM.

15 Medio mínimo: una disolución (pH 7) que contiene: ácido MOPS 40 mM, NH₄Cl 20 mM, KOH 10 mM, NaOH 10 mM, CaCl₂ 0,5 μM, Na₂SO₄ 0,276 mM, MgCl₂ 0,528 mM; una disolución de micronutrientes (pH 5): (NH₄)₆(Mo₇)₂₄ 3 nM, H₃BO₃ 400 nM, CoCl₂ 30 nM, CuSO₄ 10 nM, MnCl₂ 250 nM, ZnSO₄ 10 nM; una disolución de vitaminas, pH 4, (1 μg/l cada una): D-biotina, niacina, piridoxal-HCl, tiamina-HCl, vitamina B12; una fuente de fosfato: K₂HPO₄ 5,7 mM; FeCl₃ 20 μM.

Resultado

20 Se demostró que la cepa de *D. cellulosilyticus* con la referencia DSMZ con el número DSM 18568^T (Weon *et al.*, 2007) posee una actividad de CM-celulosa (Weon *et al.*, 2007, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 1685-1688).

25 Como se muestra en la Figura 7, *D. cellulosilyticus* es capaz de multiplicarse en un medio que contiene CM-celulosa como única fuente de carbono; la variación de la densidad óptica a 600 nm después de 10 días de crecimiento en este medio fue significativa ($\Delta DO_{600nm} = 0,5$) en comparación con el cultivo de control (medio desprovisto de fuente de carbono; $\Delta DO_{600nm} = 0,18$). Este resultado indicó que *D. cellulosilyticus* no solamente es capaz de degradar (despolimerizar) CM-celulosa, sino que también es capaz de asimilar los productos derivados de esta degradación (celobiosa y glucosa).

REIVINDICACIONES

1. El uso de una bacteria del género *Deinococcus* en un método de producción de un biocombustible o una molécula intermedia del mismo a partir de un material orgánico vegetal.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que el biocombustible es un aceite vegetal, un biodiésel, un bioalcohol tal como etanol, propanol, butanol, glicerol, butanodiol o propanodiol, un biogas, un sintegas, un biocombustible sólido o un biocombustible celulósico.
3. El uso según la reivindicación 1, en el que la molécula intermedia se selecciona de ácidos orgánicos y sus sales, tales como ácido acético, ácido propiónico, pirúvico, ácido butírico, ácido láctico o ácido succínico, o ésteres, que incluyen los ésteres formados entre alcoholes y ácidos.
- 10 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material orgánico vegetal es madera, residuos de madera, residuos forestales, residuos de fábricas de papel, cosechas agrícolas, residuos agrícolas, plantas comestibles y/o no comestibles o partes de las mismas, paja, residuos de jardines, plantas acuáticas, estiércol, residuos orgánicos municipales y/o residuos orgánicos industriales.
- 15 5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la biomasa comprende lignina, celulosa, hemicelulosa, xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano, xiloglucano, almidón, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y/o fructosa.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bacteria es viable en presencia de agentes tóxicos, en particular en presencia de disolventes orgánicos, por ejemplo etanol.
- 20 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bacteria se cultiva en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 40 °C a 70 °C, preferiblemente de 50 °C a 60 °C.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bacteria es viable o se usa en un intervalo de pH entre aproximadamente 3 y 9,5, preferiblemente entre 4 y 8.
- 25 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bacteria *Deinococcus* es capaz de convertir carbohidratos C6 y/o C5 y/o favorecer la digestión de celulosa para generar glucosa y/o favorecer la digestión de hemicelulosa para generar xilosa.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bacteria *Deinococcus* es capaz de crecer en presencia de carbohidratos C3, preferiblemente glicerol y/o piruvato sódico.
- 30 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bacteria *Deinococcus* se selecciona de *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus murrayi* y *Deinococcus cellulolyticus*, y preferiblemente de cepas de *Deinococcus geothermalis* con los n^{os} de depósito DSM11300, DSM11301, DSM11302, HAMB12480, HAMB12481, HAMB12411 o las cepas de *Deinococcus murrayi* con los n^{os} de depósito DSM11303, DSM11305 o la cepas de *Deinococcus cellulolyticus* con el n^o de depósito DSM18568^T, o cepas sustancialmente similares a ellas o mutantes de las mismas.
- 35 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha bacteria se modifica mediante evolución acelerada o mediante técnicas de reordenamiento aleatorio del ADN o mediante inserción de ADN eucariota, procariota o sintético que no es de *Deinococcus* o mediante inserción de ADN de otra cepa de *Deinococcus*, y dicha modificación afecta a la viabilidad, el crecimiento o las funciones de dicha bacteria para favorecer la modificación de biomasa.
- 40 13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se emplea un reactor de conversión de biomasa.
- 45 14. Un método para producir etanol a partir de un material orgánico vegetal, que comprende las etapas siguientes:
 - a) cultivar y/o hacer crecer una bacteria *Deinococcus* en condiciones aerobias y/o anaerobias,
 - b) exponer un material orgánico vegetal a una composición que comprende dicha bacteria *Deinococcus* o un extracto de la misma, y
 - c) recoger el etanol producido.
15. El método según la reivindicación 14, en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo de manera simultánea o de manera secuencial.

FIGURA 1

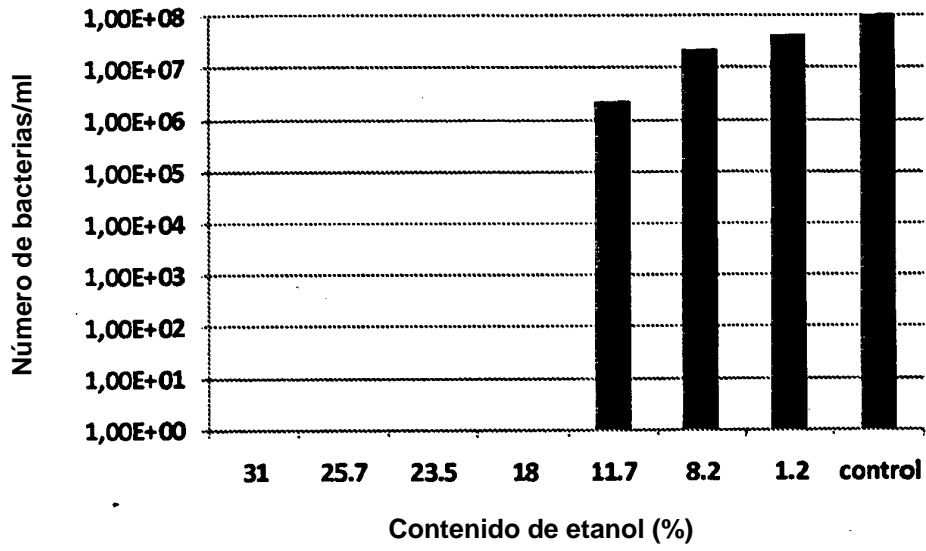


FIGURA 2

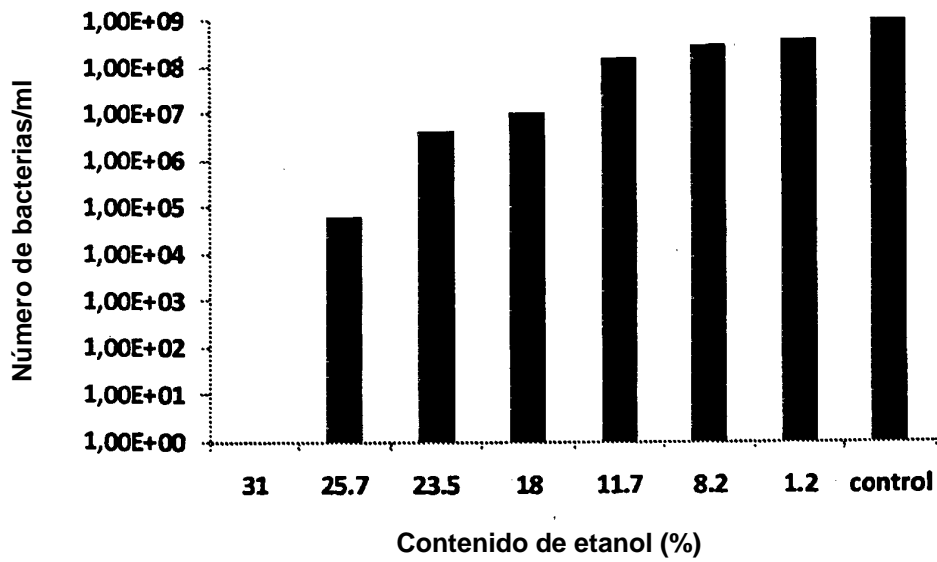


FIGURA 3

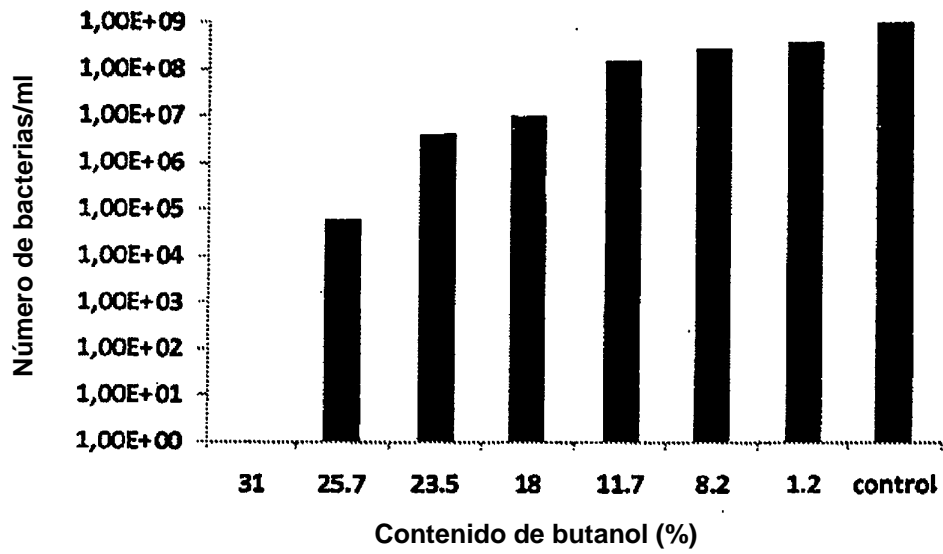


FIGURA 4

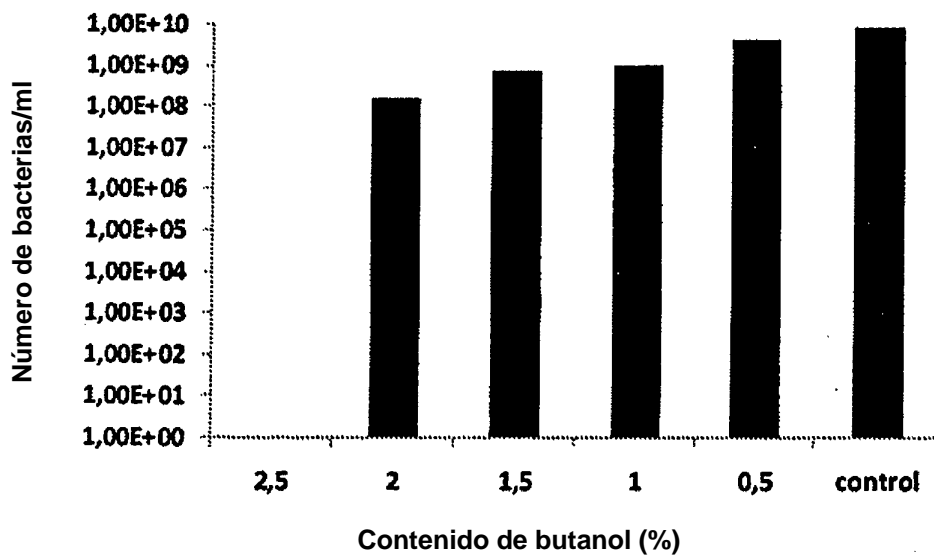


FIGURA 5

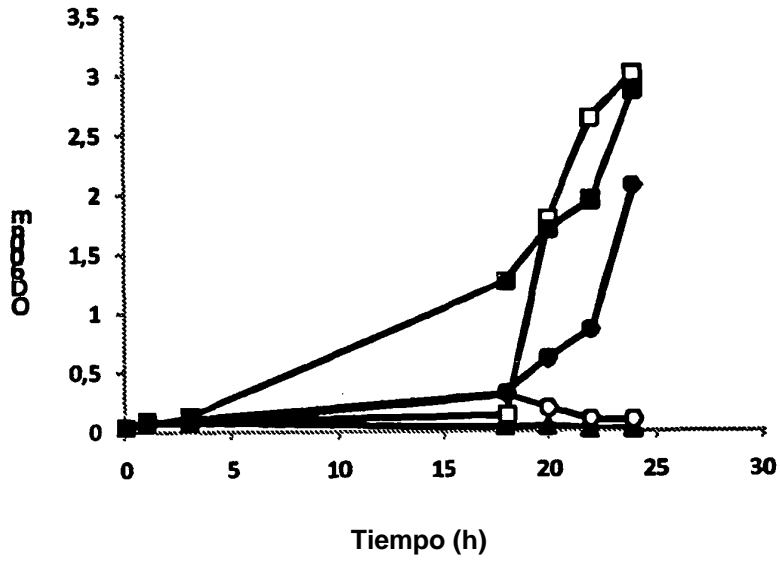


FIGURA 6

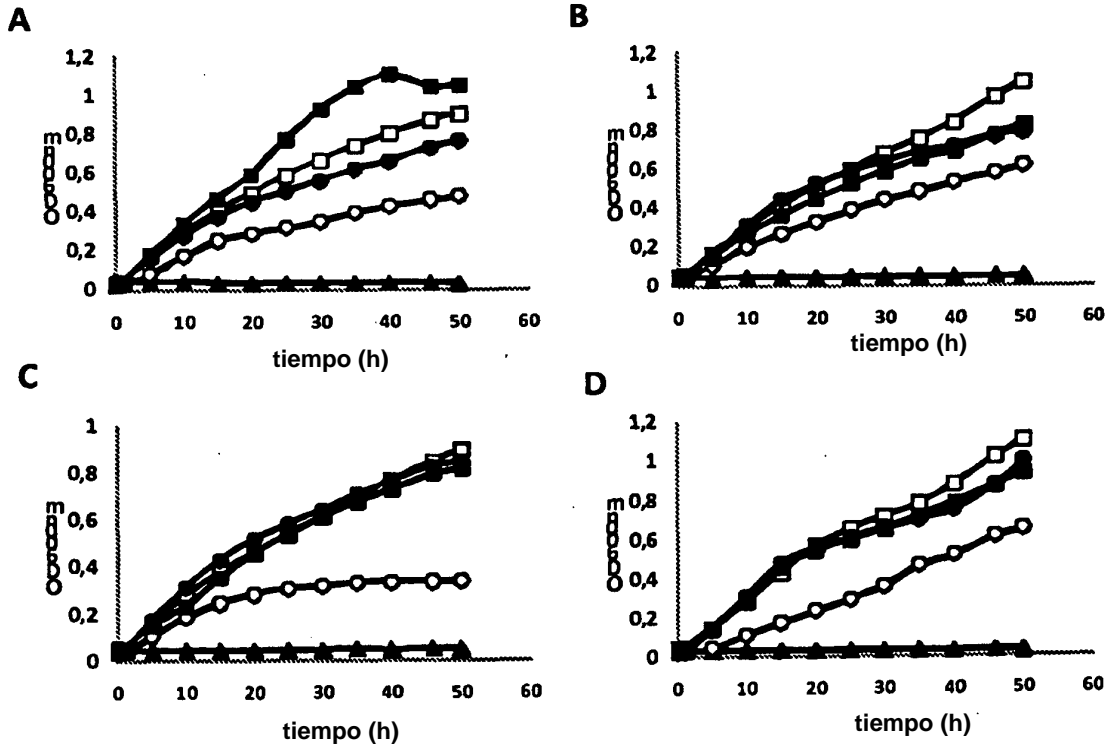


FIGURA 7

