



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0820054-8 B1

(22) Data do Depósito: 14/11/2008

(45) Data de Concessão: 31/07/2018



(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UM BIOCOMBUSTÍVEL E USO DE UMA BACTÉRIA DO GÊNERO DEINOCOCCUS PARA A PRODUÇÃO DE UM BIOCOMBUSTÍVEL

(51) Int.Cl.: C12P 7/06; C12N 1/00

(30) Prioridade Unionista: 14/11/2007 FR 0708005

(73) Titular(es): DEINOVE. CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

(72) Inventor(es): JEAN-PAUL LEONETTI; IVAN MATIC

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/05/2010

“MÉTODO PARA PRODUZIR UM BIOCOMBUSTÍVEL E USO DE UMA BACTÉRIA DO GÊNERO *DEINOCOCCUS* PARA A PRODUÇÃO DE UM BIOCOMBUSTÍVEL”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001]A presente invenção refere-se à composição e métodos para produção de bioenergia. Mais especificamente, a invenção refere-se à utilização de bactérias do gênero *Deinococcus* e/ou gêneros relacionados para a modificação de biomassa ou derivados de biomassa com uma visão à produção de produtos de bioenergia e metabólitos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002]É conhecida a utilização de microrganismos para conduzir a modificação de biomassa, essencialmente biomassa vegetal, para produzir produtos de bioenergia, por exemplo, etanol.

[003]Processos industriais atuais, apenas permitem que a cultura e o crescimento de microrganismos para a fermentação e extração de etanol a temperaturas na região de 300 °C, devido à fragilidade dos microrganismos industriais (leveduras) utilizados. Eles também implicam custos maiores de bioenergia para concentrar o etanol depois da fermentação, uma vez que as leveduras utilizadas atualmente para esta fermentação pode não suportar concentrações superiores a 100 g/l. Além disso, a fermentação destas leveduras praticamente só utiliza açúcares de C6, do tipo glicose.

[004]Ele também é conhecido por tratar o material biológico, as cepas de bactérias, inter alia, para dar propriedades melhoradas ao mesmo.

[005]Por exemplo, a Patente U.S. N ° 6,716,631 de S. Del Cardayre et al. descreve um método baseado em ciclos iterativos de recombinação e seleção / triagem para conferir as propriedades desejadas às células inteiras e aos organismos inteiros. As propriedades adicionadas são, por exemplo, o aumento da aptidão para a recombinação genética, o aumento do número de cópias do genoma, o aumento da capacidade de expressar e/ou secretar proteínas e metabólitos secundários.

[006]Através de uma abordagem genética molecular, os autores propõem técnicas

para modificar adequadamente os genomas das células e organismos para dar propriedades novas, aperfeiçoadas às suas melhoradas.

[007]O método descrito em US 6,716.631 utiliza uma população de células diferentes, o cultivo dessas células para formar células híbridas através de fusão de protoplastos, a seguir a triagem ou seleção de células, que evoluiu para adquirir uma propriedade desejada, e a repetição destas etapas até pelo menos uma célula ser obtida que possua a modificação desejada. Este método é apresentado como sendo uma alternativa vantajosa para os métodos conhecidos com base em um programa de aperfeiçoamento da cepa.

[008]Os protoplastos submetidos à referida fusão podem derivar a partir de organismos procarióticos.

[009]Uma das aplicações previstas nesta Patente U.S. é a fermentação para a produção, por exemplo, de etanol, cujo rendimento e custo são propostos para melhorar a utilização do dito método de recombinação embaralhando o DNA dos microrganismos utilizados. A título de exemplo, é feita menção da recombinação homóloga de *Rhodococcus*, conhecido como catalisador de reações em duas fases.

[010]O Pedido de Patente Internacional No. WO 01/023526 descreve a produção e utilização de bactérias resistentes à radiação e capaz de operar de biorremediação, em especial do gênero *Deinococcus* (nomeadamente *D. radiodurans* e *D. geothermalis*), modificado de modo mais eficaz para a metabolização, degradação ou desintoxicação de contaminantes orgânicos e inorgânicos, tais como radionuclídeo, metais pesados e solventes orgânicos. Recomenda-se que estas bactérias devam ser manipuladas para expressar enzimas heterólogas capazes de desintoxicar tais elementos. As cepas bacterianas são manipuladas para combinar uma variedade de funções codificadas por diferentes genes em um único hospedeiro.

[011]O Pedido de Patente de U.S. de I. Narumi et al., publicado em 18 de setembro, 2003 sob o n.º 2003/0175977, descreve um plasmídeo endógeno derivado a partir de uma cepa de *D. radiopugnans*, pUE30, que pode ser utilizado como vetor capaz de se replicar autonomamente em bactérias do gênero *Deinococcus*, e que pode ser utilizado para construir

um vetor transportador também contendo um plasmídeo capaz de se replicar de forma autônoma em *E. coli* e seus derivados, e capaz de se replicar em uma bactéria de ambos os gêneros *Deinococcus* e *E. coli*.

[012]A Patente No. 7,160,715 de C.B. Fliermans descreve os meios para medir a distribuição e frequência de geração *in vivo* de quebras de cordões do DNA. Esses meios compreendem o uso de uma proteína derivada PprA proveniente de *Deinococcus radiodurans*.

[013]O Pedido de Patente Publicado sob o No. 2004/0224320, em nome de K. Satoh et al descreve uma bactéria Gram-positiva (Access No. ATCC BAA-149 ou um mutante do mesmo) que é isolada e purificada. O isolado é capaz de degradar uma grande variedade de contaminantes orgânicos e está apto para a biorremediação de uma variedade de contaminações orgânicas, na presença de radiação ionizante.

[014]Além disso, uma recente monografia sobre a produção de etanol utilizando fermentação com as cepas de microrganismos foi publicada sob o título "Etanol Fermentação Espécies", de JR Hettenhaus, sob a égide do Departamento de Energia dos Estados Unidos e do Laboratório de Energia Renovável Nacional (16 de dezembro, 1998). Neste documento, que resume as contribuições feitas pelos participantes do estudo em questão, é apontado que:

- As cepas de somente microrganismos que podem ser utilizadas em equipamentos existentes devem ser semelhantes às aquelas já utilizadas, nomeadamente *Saccharomyces*, *Zymomonas* e *E. coli*;

- em curto prazo, o aumento da fermentação de xilose e arabinose poderia ser o objetivo almejado, sendo especificado, no entanto, que é de pouco interesse aumentar a eficácia de conversão dos outros açúcares do tipo hexose ou oligômero;

- Em longo prazo, os ganhos podem ser alcançados em relação às altas temperaturas de funcionamento e de combinação das etapas de produção de enzimas, sacarificação e hidrólise.

[015]Houve, portanto, a necessidade de um método para fermentar biomassa e obter

etanol e opcionalmente outros metabólitos, que poderiam ser implementados em condições de funcionamento significativamente melhor do que aquelas dos métodos atuais, e que ao mesmo tempo poderiam ser mais facilmente pilotadas que os métodos conhecidos e capazes de conduzir a produtos de fermentação que são mais econômicos e mais fáceis de atualizar.

[016]A invenção é capaz de trazer soluções a essas expectativas e fornecer métodos aperfeiçoados para tirar proveito a partir de biomassa, produzindo produtos bioenergéticos alternativos, que estão se tornando cada vez mais necessários devido à redução significativa das fontes de energia de origem fóssil.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[017]A presente invenção refere-se a métodos e composições para a produção de produtos de bioenergia ou metabólitos. Mais especificamente, a invenção se refere ao uso de microorganismos particulares para a produção de produtos de bioenergia ou metabólitos a partir da biomassa ou derivados da mesma. A invenção deriva inter alia da descoberta de que microorganismos do gênero *Deinococcus* possuem propriedades inesperadas e vantajosas para a modificação ou conversão de biomassa ou de derivados de biomassa com uma visão à obtenção de compostos que podem ser utilizados para produzir bioenergia, etanol, em particular, em uma escala industrial e ambos econômico e confiável.

[018]Um objeto da invenção atual, portanto, reside em um método para a produção de produtos de bioenergia ou metabólitos compreendendo colocar em contato uma biomassa ou derivados de biomassa com uma bactéria nativa ou modificada possuindo capacidade para remontar o seu genoma, no todo ou em parte, quando interrompida por um stress, de preferência uma bactéria nativa ou modificada do gênero *Deinococcus*, ou um extrato do mesmo.

[019]Um objetivo maior desta invenção é um método para a conversão de biomassa ou derivados de biomassa em produtos de bioenergia ou metabólitos compreendendo tratar a dita biomassa ou derivados de biomassa na presença de uma bactéria do gênero *Deinococcus* ou uma bactéria possuindo a capacidade de remontar o seu genoma, no todo ou em parte, quando interrompida por um estresse ou um extrato do mesmo.

[020] Em um aspecto particular, a presente invenção se refere a um método compreendendo as seguintes etapas:

- a) cultivar e/ou crescer as ditas bactéria em condições aeróbica e/ou anaeróbicas,
- b) modificar uma biomassa ou derivados de biomassa em produtos de bioenergia ou metabólitos de interesse industrial (por exemplo, fontes de bioenergia, tais como etanol, blocos de construção química, tais como ácido succínico) utilizando uma composição que compreende a dita bactéria ou um extrato da mesma, e
- c) coletar pelo menos um produto de bioenergia ou metabólito resultante de tal modificação de biomassa ou derivados de biomassa.

[021] Esta invenção também se refere ao uso de uma bactéria do gênero *Deinococcus* ou um extrato da mesma para a produção de produtos de bioenergia ou metabólitos a partir da biomassa ou derivados de biomassa.

[022] A invenção também diz respeito a uma composição que compreende uma bactéria *Deinococcus* e uma biomassa ou derivados de biomassa.

[023] A invenção também diz respeito a produtos de bioenergia produzidos utilizando um método como descrito acima.

[024] O método da invenção pode ser feito utilizando várias espécies de *Deinococcus* nativas ou modificadas, tais como, sem limitação, *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus murrayi* ou *Deinococcus cellulosilyticus*. A presente invenção mostra que a bactéria *Deinococcus* pode promover eficazmente a produção de biocombustíveis, tais como etanol, propanol, butanol glicerol, butanodiol, propanodiol, ou ácidos orgânicos de interesse químico e seus sais, tais como o ácido acético, ácido propiônico, ácido pirúvico, butírico, ácido láctico e/ou ácido succínico ou ésteres, em particular ésteres formados entre os alcoóis e ácidos acima mencionados.

[025] A invenção também mostra inesperadamente que *Deinococcus* que pode ser operado em condições, tais como temperaturas elevadas, uma ampla faixa de pH, presença de solventes, presença de substratos brutos, que servem para produzir grandes quantidades

de produtos de bioenergia ou metabólitos de vários substratos.

[026]A invenção provê, desse modo, novos métodos e composições para a produção de produtos de bioenergia ou metabólitos de uma maneira muito eficiente.

LEGENDA PARA AS FIGURAS

[027]Figura 1: efeito bactericida do etanol sobre *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 em fase de crescimento exponencial: o potencial bactericida do etanol é significativo para o conteúdo superior a 8,2 % em fase de crescimento exponencial.

[028]Figura 2: efeito bactericida do etanol sobre *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 em fase estacionária: o potencial bactericida do álcool é significativo para o conteúdo superior a 11,7 % em fase estacionária.

[029]Figura 3: Efeito Bactericida de butanol sobre *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 em fase de crescimento exponencial: o potencial bactericida de butanol é significativo para o conteúdo superior a 1,5 % em fase exponencial.

[030]Figura 4: Efeito Bactericida de butanol sobre *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 em fase estacionária: o potencial bactericida de butanol é significativo para o conteúdo superior a 2 % em fase estacionária.

[031]Figura 5: Efeito de etanol sobre o crescimento de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300: quadrado preto, 0 % de etanol; quadrado branco, 0,8 % de etanol; círculo preto, 1,2% de etanol; círculo branco, 2,4% de etanol; triângulo preto, 3,1 % de etanol.

[032]Figura 6A: Efeito do pH sobre o crescimento de *D. geothermalis* DSM 113000 (DRH05): quadrado: preto, pH8; círculo preto, pH 7; quadrado branco, pH6; círculo branco, pH5; diamante negro, pH4.

[033]Figura 6B: Efeito do pH sobre o crescimento de *D. geothermalis* HAMB1 2481 (DRH37): quadrado preto, pH8; círculo preto, pH 7; quadrado branco, pH6; círculo branco, pH5; diamante negro, pH4.

[034]Figura 6C: Efeito do pH sobre o crescimento de *D. geothermalis* HAMB1 2480 (DRH38): quadrado preto, pH8; círculo preto, pH 7; quadrado branco, pH6; círculo branco,

pH5; diamante negro, pH4.

[035]Figura 6D: Efeito do pH sobre o crescimento de *D. geothermalis* HAMBI 2411 (DRH39): quadrado preto, pH8; círculo preto, pH 7; quadrado branco, pH6; círculo branco, pH5, diamante negro, pH4.

[036]Figura 7: Crescimento de *D. cellulosilyticus* em diferentes meios líquidos. A bactéria foi cultivada como descrito no material e métodos do exemplo 9. Círculo preto, crescimento em meio rico; quadrado preto, o crescimento em meio mínimo contendo CM - celulose; quadrado branco, crescimento em meio mínimo desprovido de fonte de carbono.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[037]A presente invenção se refere a métodos para a produção de produtos de bioenergia ou metabólitos utilizando bactéria *Deinococcus*. A invenção de fato mostra que a bactéria *Deinococcus* pode produzir produtos de bioenergia ou metabólitos a partir de biomassa, de uma maneira muito eficiente.

Definições

[038]No contexto do presente pedido, o termo "bactéria do gênero *Deinococcus*" inclui cepas variantes naturais ou do tipo selvagem de *Deinococcus*, bem como cepas recombinantes, cepas obtidas através de tecnologias de mistura de DNA ou através de tecnologias de evolução direcionada.

[039]Um "extrato de uma bactéria" designa qualquer fração obtida a partir de uma bactéria, tal como um sobrenadante de célula, detritos celulares, paredes celulares, extrato de DNA, enzimas ou preparação enzimática ou qualquer preparação derivada de bactérias por tratamento químico, físico e/ou enzimático, que é essencialmente livre de bactérias vivas.

[040]Dentro do contexto da presente invenção, o termo "bioenergia" designa uma energia renovável proveniente de biomassa. Mais especificamente, o termo "produtos de bioenergia" designa "biocombustíveis" e todos os produtos finais de modificação de biomassa ou de derivados de biomassa que podem ser utilizados como combustíveis, tal como o etanol. O termo "metabólitos" designa todas as moléculas possíveis intermediárias geradas durante a

modificação de biomassa ou de derivados de biomassa em produtos de bioenergia, incluindo, mas não limitado a vários produtos químicos de interesse industrial, tais como ácidos orgânicos e blocos de construção.

[041]Dentro do contexto da presente invenção, o termo "biomassa" refere-se ao material biológico recentemente morto ou vivo que pode ser utilizado como combustível ou para a produção industrial. Mais comumente, a biomassa se refere ao crescimento da matéria vegetal para gerar eletricidade ou produzir biocombustíveis, mas também inclui matéria vegetal ou animal utilizada para a produção de fibras, químicos ou calor. Biomassa pode também incluir os resíduos biodegradáveis que podem ser queimados como combustível. O termo biomassa não inclui o material orgânico que foi transformado por processos geológicos em substâncias tais como o carvão ou o petróleo.

[042]A biomassa industrial pode ser produzida a partir de vários tipos de plantas, incluindo miscanto, switchgrass, cânhamo, beterraba, trigo, milho, choupo, salgueiro, sorgo, cana de açúcar, e uma variedade de espécies de árvores, que vão desde eucalipto à palma de óleo.

[043]A biomassa, de acordo com a invenção, compreende biomassa bruta e/ou biomassa secundária. A biomassa bruta é material não-processado proveniente de matéria biológica. Exemplos incluem produtos florestais, tais como árvores maduras inadequadas para produção de papel ou madeira, produtos agrícolas, tais como gramíneas, culturas e estrume animal, e produtos aquáticos, tais como algas e erva marinha. A biomassa secundária é qualquer material inicialmente derivado de biomassa bruta, que passou por mudanças por químicas e físicas significativas. Exemplos incluem papel, couro, algodão, cânhamo, produtos de borracha natural, processamento de alimentos por produtos, e óleos de cozinha utilizados.

[044]Como utilizado aqui, o termo "derivados de biomassa" significa todas as moléculas derivadas a partir de biomassa bruta e/ou a partir de biomassa secundária, conforme acima definido, e em particular qualquer material inicialmente derivado a partir de biomassa bruta, que passou por modificações químicas e físicas significativas, tais como por exemplo,

amido, celulose, hemicelulose e lignina.

[045] Como utilizado aqui, "plataformas intermediárias" são moléculas obtidas através de transformação físico-química ou bioquímica de derivados de biomassa, tais como açúcares, amidos, e gás sintético baseado em bio (syngas).

Descrição Detalhada

[046] A presente invenção propõe a utilização de bactéria *Deinococcus* para produzir produtos de bioenergia ou metabólitos a partir de biomassa. A presente invenção de fato mostra que as bactérias do gênero *Deinococcus* exibem propriedades inesperadas que lhes permitem cooperar na produção de produtos de bioenergia ou metabólito, através da biomassa de fermentação ou derivados de biomassa.

[047] A bactéria *Deinococcus* tem mostrado ter a capacidade de remontar o seu genoma, no todo ou em parte, quando interrompida por um stress (PCT/EP2006/005826 Radman Zahradka). Como mencionado anteriormente, estas bactérias, especialmente *D. radiodurans*, têm sido propostas para biorremediação. No entanto, nunca foi descrito ou sugerido que a bactéria *Deinococcus* seria capaz de produzir produtos de bioenergia e metabólitos a partir de biomassa. Além disso, nunca tinha sido sugerido que a bactéria *Deinococcus* possuindo as propriedades biológicas necessárias poderiam ser isoladas e cultivadas.

[048] A invenção apresenta agora, pela primeira vez, que é possível isolar ou cultivar a bactéria *Deinococcus* possuindo pelo menos uma das seguintes propriedades, e que a dita bactéria é capaz de produzir produtos de bioenergia ou metabólito:

- É viável ou funcional em altas temperaturas (por exemplo, cerca de 40 a 70 °C);
- É viável ou funcional dentro de uma faixa de pH de cerca de 3 a cerca de 9,5, de preferência entre cerca de 4 e cerca de 8;
- É viável e funcional na presença de agentes tóxicos, em particular solventes orgânicos, por exemplo, o etanol;
- É capaz de converter açúcares C6 e C5;
- É capaz de promover a digestão celulose para render glicose;

- É capaz de promover digestão hemicelulose para render xilose;
- É capaz de crescer em condições aeróbicas e/ou anaeróbicas na presença de uma fonte de carbono adequada.

[049]Além disso, a bactéria *Deinococcus* é geralmente desprovida de patogenicidade, e pode ser utilizada, por conseguinte, sem confinamento específico.

[050]A invenção, desse modo descreve, pela primeira vez, a capacidade da bactéria *Deinococcus* fazer produtos de bioenergia ou metabólito a partir de biomassa, bem como a sua capacidade inesperada de ser cultivada e crescida sob condições específicas adaptadas a tal utilização. A invenção também propõe a utilização, para produção de produtos de bioenergia ou metabólito, qualquer bactéria possuindo a capacidade para remontar o seu genoma, no todo ou em parte, quando interrompida por um stress.

[051]Em uma modalidade preferida, o método desta invenção utiliza uma espécie *Deinococcus* termofílica, preferencialmente selecionada a partir *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans* e *Deinococcus murrayi*.

[052]Em uma modalidade preferida da invenção, o método utiliza uma bactéria *Deinococcus* viável na presença de agentes tóxicos, em particular na presença de solventes orgânicos, por exemplo, etanol. O presente pedido de fato mostra que as cepas de *Deinococcus* podem ser cultivadas na presença de altos níveis de solventes, tais como etanol ou butanol, permitindo a produção de biocombustíveis de uma maneira mais eficiente.

[053]Em outra modalidade preferida da presente invenção, o método utiliza uma bactéria que pode ser cultivada em uma faixa de temperatura de aproximadamente 40 a 70 °C, preferencialmente de 50 °C a 60 °C. Em uma modalidade mais preferida, o método utiliza uma bactéria que pode tanto ser cultivada sob temperatura elevada (acima de 40 °C) e na presença de um agente tóxico ou solvente orgânico, como descrito acima.

[054]Em uma modalidade mais particular da invenção, o método utiliza uma bactéria *Deinococcus* que pode ser viável ou funcional sob condições de concentração de NaCl ou sais equivalente possivelmente atingindo cerca de 5 % em peso / volume.

[055]Em outra modalidade preferida da invenção, o método utiliza uma bactéria que é viável em um intervalo de pH entre aproximadamente 3 e 9,5, preferencialmente entre 4 e 8. Na verdade, os inventores descobriram que as cepas de *Deinococcus* podem ser mantidas em condições muito severas, as quais são particularmente vantajosas para a conversão de biomassa.

[056]Em uma modalidade preferida, a invenção utiliza uma bactéria *Deinococcus* que é capaz de converter os açúcares C6 e/ou C5 e/ou promover a digestão de celulose para gerar glicose e/ou promover a digestão de hemicelulose para gerar xilose.

[057]Em uma modalidade particular, a invenção refere-se a um método, no qual a dita bactéria *Deinococcus* é capaz de crescer na presença de xilan e promover a digestão de xilan.

[058]Tais atividades enzimáticas, combinadas com uma elevada termo-resistência, uma ampla faixa de tolerância de pH e de tolerância de agentes tóxicos, nunca foram registradas antes e são notáveis. Como mostrado nos exemplos, as bactérias *Deinococcus* possuindo as propriedades acima podem ser isoladas, cultivadas e produzem quantidades substanciais de produtos de bioenergia ou metabólitos a partir de biomassa.

[059]A este respeito, outra vantagem da invenção reside em um método, em que a dita bactéria *Deinococcus* é cultivada em um meio mínimo contendo açúcares C6, preferencialmente glicose, ou mais açúcares complexos, preferencialmente, sacarose, celobiose ou amido, ou açúcares C5, preferencialmente, xilose, como fonte de carbono. Uma vantagem adicional da presente invenção reside no fato de que a dita bactéria *Deinococcus* pode ser cultivada na presença de hidratos de carbono C3, preferencialmente, glicerol ou piruvato de sódio.

[060]Os exemplos específicos de bactérias adequadas para uso na presente invenção são cepas de *Deinococcus geothermalis* com nenhuma deposição. DSM 11300, DSM 11301, DSM 11302, HAMB12480, HAMB12481 e HAMB12411; cepas de *Deinococcus murrayi* com nenhuma deposição. DSM 11303 e DSM 11305, ou cepa de *Deinococcus cellulosilyticus*

com nenhuma deposição. DSM18568T (listados no respectivo quadro 1), ou cepas substancialmente similares a mesma ou mutantes da mesma.

Tabela 1: Lista de cepas de *Deinococcus*

Designação	Gênero	Espécies	Ref.	Código	Temp. °C	Referência Bibliográfica
DRH 05	<i>Deinococcus</i>	<i>geothermali</i>	DSM	11300	45 a 50	Ferreira et al., 1997 <u>Int J. Syst. Bacteriol</u> ,47(4): 939-47
DRH 06	<i>Deinococcus</i>	<i>geothermali</i>	DSM	11301	45 a 50	Ferreira et al., 1997 <u>Int J. Syst. Bacteriol</u> ,47(4): 939
DRH 07	<i>Deinococcus</i>	<i>geothermali</i>	DSM	11302	45 a 50	Ferreira et al., 1997 <u>Int J. Syst. Bacteriol</u> ,47(4): 939
DRH 37	<i>Deinococcus</i>	<i>geothermali</i>	HAMBI	2481	45 a 50	Kolari et al., 2003 J. Ind. Microbiol Biothechnol, 30: 225-238
DRH 38	<i>Deinococcus</i>	<i>geothermali</i>	HAMBI	2480	45 a 50	Kolari et al., 2003 J. Ind. Microbiol Biothechnol, 30: 225-238
DRH 39	<i>Deinococcus</i>	<i>geothermali</i>	HAMBI	2411	45 a 50	Väisänen et al.,1997, Applied Microbiology 84: 1069-1084
DRH 08	<i>Deinococcus</i>	<i>murrayi</i>	DSM	11303	45 a 50	Ferreira et al., 1997 <u>Int J. Syst. Bacteriol</u> ,47(4): 939
DRH 10	<i>Deinococcus</i>	<i>murrayi</i>	DSM	11305	45 a 50	Ferreira et al., 1997 <u>Int J. Syst. Bacteriol</u> ,47(4): 939
DRH 46	<i>Deinococcus</i>	<i>cellulosilyti</i>	DSM	18568 ^T	45	Weon et al., 2007, Int J of Syst & Evolutionary Microbiol, 57, 1685-1688

[061]Todas as cepas listadas na tabela acima são capazes de crescer em meio de cultura do tipo PGY em pH7. Outros meios de cultura adequados estão descritos na seção experimental.

[062]Deve ser entendido que as cepas de *Deinococcus* adicionais possuindo as propriedades como atualmente demonstradas e descobertas podem agora ser rastreadas e identificadas pelos versados na técnica, com base nos ensinamentos do presente pedido, por exemplo, seguindo orientação e testes, conforme descrito na seção experimental.

[063] Como mencionado acima, as cepas de *Deinococcus*, utilizadas no presente pedido podem ser utilizadas tanto na forma nativa, ou modificada (por exemplo, quimicamente ou geneticamente) para adquirir propriedades melhoradas. A este respeito, em uma modalidade particular, o método utiliza uma bactéria *Deinococcus* que é modificada pela evolução acelerada ou pelas tecnologias de mistura de DNA ou pela inserção de eucariontes, procariotes ou DNA de *Deinococcus* não-sintéticos ou pela inserção de outro DNA de cepa de *Deinococcus*, a dita modificação afetando a viabilidade, o crescimento ou as funções da referida bactéria, a fim de promover a modificação de biomassa.

[064] Em outra modalidade da invenção, a bactéria utilizada pode ser uma cepa bacteriana recombinante ou modificada, vantajosamente utilizando um método tal como descrito no pedido de patente internacional No. PCT/EP2006/005826.

[065] Como discutido acima, a invenção mostra que a bactéria do gênero *Deinococcus*, ou os derivados da mesma, selecionada, por exemplo, entre *D. geothermalis*, *D. radiodurans* ou *D. murrayi*, apresentam propriedades vantajosas e são capazes de produzir produtos de bioenergia ou metabólitos provenientes de vários substratos brutos. A presente invenção, portanto, refere-se ao uso de bactérias do gênero *Deinococcus* para a produção de bioenergia ou metabólitos a partir de biomassa ou os derivados de biomassa. A presente invenção também se refere a um método para produzir produtos de bioenergia a partir de biomassa e metabólitos ou derivados de biomassa, expondo ou cultivando a dita biomassa na presença de bactérias do gênero *Deinococcus*, ou um extrato da mesma e recuperando o produto de bioenergia ou metabolito produzido.

[066] A cultura ou exposição podem ser feita em qualquer condição ou ambiente adequado que permita a modificação da biomassa ou derivado para produzir produto de bioenergia. Neste sentido, o método pode ser realizado em um reator, em um fermentador, ao ar livre, na presença de nutrientes ou aditivos adequados, se necessário. O método é geralmente conduzido sob condições de pH, temperatura acima de 40 °C, e na presença de substratos adequados.

[067]Um objeto específico da presente invenção reside em um método compreendendo as seguintes etapas:

- a) cultura e/ou o cultivo da dita bactéria em condições aeróbias e/ou anaeróbias,
- b) modificar (por exemplo, conversão ou tratamento) a biomassa ou derivados de biomassa em produtos de bioenergia ou metabólitos utilizando uma composição que compreende a dita bactéria ou um extrato do mesmo, e
- c) coletar pelo menos um produto de bioenergia ou metabólito resultante a partir da dita modificação de biomassa ou derivados de biomassa.

[068]Outro objeto da invenção reside em um método para converter a biomassa ou derivados de biomassa utilizando pelo menos uma bactéria ou extrato bacteriano, tal como definido acima ou uma composição tal como acima descrito, compreendendo uma combinação de:

- pelo menos uma operação de colocar em cultura e desenvolvimento a dita cepa bacteriana ou o dito extrato de levedura bacteriana sob condições de crescimento e desenvolvimento adequado,
- pelo menos uma operação para converter a biomassa ou um derivado de biomassa sob a ação de quantidades adequadas da dita cepa bacteriana ou dito extrato de levedura bacteriana, sob condições adequadas para a referida conversão da biomassa, ou derivados da biomassa, e
- coletar pelo menos um produto de bioenergia ou metabólito derivado a partir da dita conversão da biomassa ou de derivados de biomassa, em particular coletar o etanol dessa forma produzido.

[069]Nos métodos acima, a primeira etapa de cultura e/ou cultivo da dita bactéria e a segunda etapa de modificação de biomassa ou derivados de biomassa em produtos de bioenergia ou metabólitos utilizando uma composição que compreende a dita bactéria ou um extrato da mesma, pode ser realizada simultaneamente, ou seqüencialmente; a terceira etapa da coleta de produtos de bioenergia ou de metabólitos pode ser realizada simultaneamente

com a primeira e/ou a segunda etapa, ou sequencialmente. Neste contexto, a biomassa pode ser entrar em contato com a bactéria sob condições adequadas para permitir a expansão da referida bactéria, aumentando assim a eficiência do processo. Alternativamente, as cepas bacterianas podem ser expandidas separadamente, sob condições de cultivo adequado, e posteriormente adicionadas à biomassa. Deve ser entendido que as quantidades exatas de bactérias utilizadas inicialmente para transformar de modo eficaz a biomassa em produtos de bioenergia ou metabólitos substanciais podem ser ajustadas pelo versado na técnica dependendo do tipo de bactéria, o tipo de biomassa ou derivados, e as condições de cultura.

[070]Em uma modalidade particular, do método de acordo com a invenção, a bactéria *Deinococcus* é cultivada separadamente a partir da conversão de biomassa.

[071]Em outra modalidade particular, o método utiliza uma composição que compreende uma bactéria *Deinococcus* ou um extrato do mesmo e pelo menos um aditivo ou excipiente adequado, preferencialmente pelo menos um agente escolhido a partir do grupo consistindo em agentes antiespumantes e agentes nutrientes. Os agentes antiespumantes apropriados são dispersantes, detergentes e tensoativos em particular, e mais geralmente compostos anfifílicos.

[072]Em uma modalidade particular, o método da invenção é desempenhado em um reator de conversão de biomassa. Por "reator" é entendido um tanque de fermentação convencional ou qualquer aparelho ou sistema de conversão de biomassa, especialmente designados para implementar a invenção e, portanto, consistindo em biorreatores, biofiltros, contadores biológicos rotativos, e outros gasosos e/ou biorreatores fase líquida para o tratamento de biomassa ou produtos derivados de biomassa. O aparelho, que pode ser utilizado de acordo com a invenção pode ser utilizada de forma contínua ou em cargas de batelada.

[073]No reator, para implementar o método da invenção, pelo menos uma bactéria ou extrato bacteriano da invenção é utilizado, e/ou pelo menos uma composição, tal como definido anteriormente, enquanto o dito reator é disposto e fornecido de modo que as condições físico-químicas são definidas e mantidas de modo que a dita bactéria seja operacional

para a aplicação sob consideração e de modo que, eventualmente, o crescimento bacteriano é possível e preferencialmente promovido no mesmo.

[074]Em outra modalidade do método da invenção, as bactérias são cultivadas em um reator, durante a conversão de biomassa ou de derivados de biomassa, enquanto as condições físico-químicas adequadas são ajustadas e mantidas para esse crescimento bacteriano a ser possível, e preferencialmente promovida. Por exemplo, um Erlenmeyer de 500 ml pode ser utilizado na presença de 100 ml de 167 meio Thermus ou meio mínimo descrito abaixo, a uma temperatura de 50 °C.

[075]Em modalidades alternativas da invenção, a conversão de biomassa ou de derivados de biomassa é conduzida sob aerobiose, anaerobiose ou sob microaerobiose.

[076]De acordo com um outro aspecto, o objeto da invenção é um reator para a conversão de biomassa ou de derivados de biomassa, utilizando pelo menos uma bactéria *Deinococcus* ou extrato bacteriano, tal como definido acima, ou uma composição, tal como acima definido.

[077]O processo desta invenção pode ser utilizado para produzir bioenergia a partir de vários tipos de biomassa. Em uma modalidade preferida, a biomassa inclui madeira e resíduos de madeira, resíduos florestais, resíduos de rolamento de papel, culturas agrícolas, resíduos agrícolas, alimentares e/ou plantas não-comestíveis ou partes dos mesmos, palha, resíduos de jardim, plantas aquáticas, resíduos animais, resíduos de operação de gados, esterco, resíduos municipais orgânicos e/ou resíduos orgânicos industriais. A biomassa pode também incluir os resíduos biodegradáveis.

[078]Em uma modalidade particular, a invenção refere-se um método para modificar a biomassa ou os derivados de biomassa ou plataformas intermediárias em produtos de bioenergia ou metabólitos, em que os derivados de biomassa são preferencialmente a lignina, celulose, hemicelulose, amido, e em que as plataformas intermediárias são preferencialmente carboidratos, tais como xilan, glucuronoxilan, arabinoxilan, glucomannan, xiloglucan, amido, sacarose, lactose, maltose, trealose, glicose, xilose, manose, arabinose, ramnose, galactose

e/ou frutose.

[079]Um objeto particular da invenção reside em um método para a produção dos biocombustíveis. Dentro do contexto da presente invenção, o termo "biocombustível" designa um combustível derivado a partir de uma fonte de carbono biológico ou morto. O biocombustível pode ser produzido a partir de recursos renováveis, especialmente a biomassa vegetal ou animal, ou a partir de resíduos urbanos e industriais. O biocombustível de acordo com a invenção compreende "biocombustíveis de primeira geração" e/ou "biocombustíveis de segunda geração".

[080]Os biocombustíveis de primeira geração são obtidos a partir de material orgânico vegetal ou animal, de preferência a partir de açúcar, amido, óleo vegetal ou gordura animal. A principal fonte para a produção de biocombustíveis de primeira geração são as plantas comestíveis ou partes das mesmas. Os biocombustíveis de primeira geração incluem o óleo vegetal, biodiesel, bioalcoóis, biogás, gás de síntese e de biocombustíveis sólidos. Os bioalcoóis incluem etanol, propanol e butanol. Mais preferencialmente, o método da invenção é utilizado para a produção de etanol, propanol, butanol. O biocombustível mais preferido é o etanol.

[081]Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos preferencialmente a partir de plantas não-comestíveis ou partes não-comestíveis das plantas. Eles incluem culturas não-alimentares, resíduos de biomassa, talos de trigo, milho e madeira. Preferencialmente, os biocombustíveis de acordo com a invenção incluem biocombustíveis celulósicos.

[082]Dependendo da biomassa de partida, a produção de produtos de bioenergia ou metabólitos, tais como biocombustíveis, podem exigir duas etapas sucessivas: uma etapa de hidrólise, catalisada por enzimas, preferencialmente celulasas ou lacases, que quebram as cadeias longas, cadeias de carboidratos complexos, tais como celulose ou lignina, respectivamente, em pequenos açúcares fermentáveis, e uma etapa de fermentação, o que adicionalmente degrada os compostos orgânicos, tais como açúcares, em alcoóis. Deve ser salientado que as cepas de *Deinococcus* de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas

para uma ou ambas as ditas reações. De fato, a invenção mostra que *Deinococcus* pode hidrolisar as cadeias longas de carboidrato (por exemplo, xilan ou celulose) e pode também produzir metabólitos (por exemplo, etanol, glicerol, butanodiol, propanodiol, bem como ácido acético, propiônico, pirúvico e butírico) a partir dos açúcares C3, C5 ou C6. Se desejado, no entanto, deveria ser notado que as cepas *Deinococcus* podem ser utilizadas em combinação com quaisquer outras cepas bacterianas.

[083]Os exemplos a seguir são dados para fins de ilustração e não por meio de limitação.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Testes de seleção

[084]Para determinar se um microrganismo é equipado com as propriedades exigidas pela invenção, os testes específicos devem ser realizados a fim de determinar se um gênero, espécie e/ou uma cepa bacteriana é capaz de ter as propriedades requeridas e em função de um método para a conversão de biomassa ou derivados de biomassa, e para determinar quais aperfeiçoamentos significativos podem assim ser obtidos.

[085]Estes testes específicos de acordo com a invenção são realizados nas condições a seguir:

Meio de cultura:

[086]*D. geothermalis* (DG) é cultivado em 50 °C, sob agitação, em meio aeróbio. O meio de cultura 167 é utilizado para manter as cepas. O meio mínimo é utilizado em experimentos de fermentação, em particular, para caracterizar os metabólitos. Neste caso, 500 ml de meio de cultura são incubados por 1 a 7 dias, sob agitação em um Erlenmeyer de 1 L, após ter sido semeado com 5 ml de cultura confluenta de *D.G.*

Médio Thermus 167

Tryptone	1	g
Extrato de levedura	1	g
Agar	28	g

Ácido nitrilotriacético	100	mg
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
Solução de elementos de prova (ver abaixo)	0,5	ml
Tampão de fosfato (ver abaixo)	100	ml
H ₂ O	900	ml
Ajustar para pH 7,2 com NaOH, autoclave a 121 ^o C por 15 min. Autoclave o tampão de fosfato separadamente e adicionar ao meio		

Tampão de 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 para ph 7,2		

Solução de elementos de prova:

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

Meio mínimo

Tampão MOPS

Ácido MOPS	400	mM
------------	-----	----

NH ₄ Cl	200	mM
NaOH	100	mM
KOH	100	mM
CaCl ₂	5	M
K ₂ SO ₄	276	mM
MgCl ₂	5,28	mM
pH 7, filtrado, esterilizado		

Fonte de carbono

Glicose	160	mM
Filtrada, esterilizada		

Fosfato

K ₂ HPO ₄	12,3	mM
KH ₂ PO ₄	7,7	mM
Filtrada, esterilizada		

Vitaminas

D-biotin	10	μM
Niacine	10	μM
Piridoxal-HCl	10	μM
Tiamine-HCl	10	μM
Armazenar a pH 4, filtrado, esterilizado		

Solução de elementos de prova

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

Fonte de ferro

FeCl ₃	200	M
Citrato de Sódio	200	M
Filtrada, esterilizada		

Aminoácidos

Ser	100	mM
Gln	100	mM
Filtrada, esterilizada		

[087]Estas soluções de armazenamento em estado concentrado de 10X são diluídas de forma extemporânea.

Deteccção da atividade de lacase das bactérias:

Princípio:



Lacase

Reagentes:

A. Tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 6,5 a 30 °C

B. Seringaldazina 0,216 mM (3 ml são preparadas em etanol absoluto a partir de seringaldazina obtida de Sigma Prod., N ° S-7896).

C. Enzima

	Teste	Espaço em branco
H ₂ O	0,50 ml	Meio não-fermentado, 0,5 ml ou diluição
Reagente A	2,20 ml	2,20 ml
Reagente B	0,3 ml	0,3 ml
Reagente C	Meio Fermentado, 0,5 ml ou diluição	0

[088]O aumento na densidade óptica é registrado em 530 nm.

[089]Sob estas condições, uma unidade de enzima produz um aumento na densidade

óptica de 0,001 por minuto a pH 6,5 e em 30 °C.

Detecção da atividade da celulase das bactérias:

Princípio:

[090]O teste é baseado no acompanhamento da conversão de NAD em NADH durante a degradação da celulose. Um aumento na absorção é então monitorado a 340 nm, seguindo as instruções do fornecedor, disponível no endereço na internet: (<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/18160/Cellulase.pdf>)

Detecção da produção de etanol:

Etanol é quantificado utilizando dois métodos.

Método enzimático: ADH

Etanol + NAD $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ Acetaldeído + NADH

[091]Este método é baseado no acompanhamento da conversão de NAD em NADH na presença de etanol e álcool desidrogenase.

[092]Esta reação se traduz como um aumento na absorção a 340 nm. Para esta medição, o Sigma N7160, kit foi utilizado seguindo as instruções do fabricante disponíveis no link de Internet:

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

Medição através de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reserva:

Condições:

HPLC Gilson, com injetor automático de detecção por refratometria,

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

Temperatura em coluna: 65 °C

Fase móvel: ácido sulfúrico 0,005 N

Taxa de Fluxo: 0,600 ml / min

[093]Primeiro, uma curva de calibração é feita pela injeção de meio de cultura contendo concentrações conhecidas de etanol na coluna. A área do pico eluído em 22,26 min correspondente ao etanol é medida. A curva de calibração é traçada.

[094]Em seguida, a quantidade de etanol produzido pela bactéria é medido através da injeção do sobrenadante de cultura para a coluna. A área do pico eluído em 22,26 min e corresponde ao etanol é medida. A concentração de etanol presente no sobrenadante é deduzida por comparação com a curva de calibração.

[095]A detecção e quantificação dos outros metabólitos, possivelmente produzidos em diversas proporções podem ser feitas seguindo os métodos convencionais de análise e avaliação.

[096]Bactérias são organismos haplóides que se reproduzem por divisão binária e que se alimentam de substâncias orgânicas e minerais encontradas no ambiente.

[097]Suas exigências de gás, especialmente com relação ao oxigênio, são variadas e a cultura e as técnicas de fermentação a serem utilizadas devem ser adaptadas de acordo com se eles são microorganismos estritamente aeróbios ou facultativos, aero-anaeróbicos facultativos.

[098]A atividade de celulase, vantajosamente exigida pela invenção, participa na degradação da celulose, enquanto a atividade de lacase permite ou facilita a degradação de lignina.

[099]A produção, proveniente da fermentação da biomassa, dos produtos de bioenergia, tais como etanol, em particular e/ou outros metabólitos é realizada seguindo as condições de funcionamento a serem adaptadas posteriormente para testes iterativos para as condições e parâmetros da técnica da presente invenção, que são em particular, a quantidade de meio de cultura bacteriana, as condições operacionais de temperatura e/ou pressão, e as opções de fermentação aeróbia, anaeróbia ou microaerófila.

[0100]Após os testes e os ensaios específicos descritos acima, as cepas selecionadas naturais ou modificadas geneticamente são implementadas de acordo com o método da invenção.

Exemplo 2: Produção de etanol na presença de *Deinococcus geothermalis*

[0101]Em um Erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de meio mínimo a 50 °C, um

inóculo de *D. geothermalis* 10^{10} (DG) é acrescentado a 50 °C. A cultura é colocada sob agitação para promover a aeração.

[0102]Esta cultura está pronta para ser utilizada em um tanque convencional de fermentação de biomassa no qual, sob melhores condições, etanol e outros metabólitos podem ser obtidos com um rendimento excelente em 55 °C.

[0103]Depois de 1 a 7 dias no reator com a biomassa a ser tratada, a presença do etanol e metabólitos acima mencionados foi quantificada por HPLC (segundo o protocolo descrito acima). O desaparecimento de glicose foi observado e a produção concomitante de etanol, cuja concentração foi estimada analiticamente. Outros metabólitos de interesse foram detectados. A substituição da glicose por xilose no meio de cultura também permite o crescimento bacteriano e a produção de etanol.

[0104]Em uma variante de modalidade deste exemplo, resultados semelhantes podem ser obtidos através da realização de ambas as culturas bacterianas e fermentação no mesmo tanque.

Exemplo 3: Os efeitos bactericidas do etanol e butanol em *geothermalis Deinococcus*

Material e métodos

[0105]Este método permite a avaliação dos efeitos bactericidas de solventes orgânicos sobre bactérias no crescimento ou na fase estacionária. Os solventes testados são o etanol e butanol. As bactérias testadas pertencendo ao gênero *Deinococcus*:

- desenvolver entre 40 e 70 °C
- estão em operação entre pH 3 e pH 9.5
- são capazes de montar, no todo ou em parte, a sua separação do genoma por um stress, nomeadamente através da irradiação, em especial por UV ou raios gama, por dessecação, pela ação da enzima, por ultra-som ou pelo estresse químico.

[0106]O teste deve ser realizado à temperatura ótima de crescimento para a cepa testada. A partir de uma pré-cultura em fase estacionária em um meio enriquecido, 10 ml de meio de enriquecimento é semeado em 1% v / v. O meio enriquecido é composto de: 2 g/l de

peptona, 5 g/l de extrato de levedura e 10 g de glicose/l: solução esterilizada através de autoclave (20 minutos, 120 °C). Para esta solução são adicionadas as seguintes soluções: tampão de MOPS (10X) pH7 [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 em C₆H₅Na₃O₇ 20 mM; K₂HPO₄ 1 g / l: soluções esterilizadas através de filtração (45 μm).

[0107]200 mL de cultura estão distribuídas em uma microplaca de 96 cavidades. Para evitar qualquer fenômeno da evaporação de solvente, a microplaca é coberta com uma película impermeável estéril.

[0108]Uma vez concluída a fase de crescimento exponencial (densidade óptica de 0,5 a 600 nm), ou uma vez que a fase estacionária (planalto), for atingida, o solvente é adicionado. O conteúdo testado é de 0 a 31 % de etanol e de 0 a 2,5 % para o butanol. A cultura é então incubada sob agitação por uma hora.

[0109]Visto: No final da incubação, e para cada concentração em solvente, 20 μl da cultura são transferidos para outra microplaca e são diluídos em cascata (diluições em 1 / 10 por 9 cavidades). O meio de cultura de diluição é um meio enriquecido. 5 μl de cada diluição são colocados em repouso em meio de Agar PGY. Peptona 5 g/l, extrato de levedura 2,5 g/l, glicose 0,5 g/l, ágar 14 g/l: meio esterilizado por 20 minutos de autoclave a 120 °C. Uma vez que permite o crescimento, para cada percentual de solvente testado, uma contagem é realizada para avaliar a influência de solventes orgânicos sobre a cepa.

Resultados:

[0110]A concentração de solvente na qual se considera que haja uma perda da viabilidade bacteriana corresponde à concentração mínima de solvente na qual se observa a perda de um registro em relação ao controle.

[0111]As cepas testadas (Figuras 1 a 4) apresentam resistência satisfatória para os solventes provenientes da perspectiva de uma aplicação industrial de um fermentador.

Exemplo 4: o crescimento de bactéria na presença de fontes de carbono C3, C5 e C6

Material e Métodos

[0112]Pré-culturas foram realizadas, tanto em meio A contendo peptona A (2 g/l), extrato de levedura (5 g/l), glicose (10 g/l) ou em meio PGY. Após a centrifugação do meio de cultura, o pélete bacteriano foi lavado duas vezes com meio mínimo A para eliminar todas as fontes de alimento no inóculo. Este inóculo foi utilizado para semear o meio de cultura A (1 / 66) (200 mL) contendo uma das seguintes fontes do carbono a 1 % (W / v): D (+) glicose, D (+) celobiose, sacarose, amido, D (+) xilose, xilan proveniente de madeira de bétula, glicerol, piruvato de sódio. No caso de cepas DRH07, DRH39, DRH08 e DRH10, o glutamato (10 mM) foi adicionado ao meio de cultura. O crescimento bacteriano foi conduzido a 45 °C em microplacas de 96 cavidades, sob agitação e seguido por medição da densidade óptica a 544 nm utilizando um espectrofotômetro (Chameleon multilabel detection Platform plate, ScienceTec) ou a 600 nm utilizando uma leitora de microplaca spectrostar OMEGA (BMG LabTech).

[0113]Referências de fontes de carbono utilizadas: Xlan proveniente de madeira de bétula (95588, Fluka), celobiose (22150, Fluka), D (+) xilose (95730, Fluka), glicose (G8270-1KG, Sigma), sacarose (S9378-1KG, Sigma), amido (S9765-500G, Sigma), glicerol (453752, CarloErba), piruvato de sódio (Sigma).

Composição e preparação de meios de cultura

[0114]PGY Médio: Peptona (10 g/l), glicose (1 g/l), extrato de levedura (5 g/l), a mistura é autoclavada por 20 minutos a 120 °C.

[0115]Meio A: as várias soluções utilizadas para preparar o meio A foram preparadas a partir de uma solução armazenada esterilizada por filtração:

- A solução (pH7) contendo: tampão de ácido MOPS 40 mM, NH₄Cl 20 mM, KOH 10 mM, NaOH 10 mM, CaCl₂ 0,5 mM, Na₂SO₄ 0,276 mM, MgCl₂ 0,528 mM.

- Uma solução de micronutrientes (pH5): (NH₄)₆(MO₇)₂₄ 3 nM, H₃BO₃ 400 nM, CoCl₂ 30 nM, 10 nM CuSO₄, MnCl₂ 250 nM, ZnSO₄ 10 nM.

- Solução de vitaminas, pH4 (1 mg / l de cada): D-biotin, niacina, piridoxina HCl, tiamina-HCl, vitamina B12.

- Fonte de fosfato: K_2HPO_4 5,7 mM.

- $FeCl_3$ 20 mM (preparados em uma solução de citrato de sódio, em seguida, filtrada).

Resultados

[0116]As bactérias listadas na Tabela 2 (abaixo) são capazes de se multiplicar em meio de cultura mínimo (meio A), contendo como única fonte de carbono, açúcar em C6, como a glicose, sacarose, celobiose e amido. É observado que as cepas DRH37 e DRH06 também são capazes de crescer na presença de glicerol e piruvato de sódio (carboidratos em C3).

[0117]As bactérias listadas na Tabela 3 também são capazes de se multiplicar em meio de cultura mínimo contendo açúcares em C5 (xilan ou xilose) como a única fonte de carbono; com exceção das cepas DRH06 e DRH07 que não são capazes de crescer na presença de xilan e xilose, respectivamente.

[0118]Tabela 2: Testes de assimilação das diferentes fontes de carbono em C3 e C6 realizados em várias espécies de *D. geothermalis* e *D. murrayi*: - $\Delta OD < 0,2$; + $\Delta OD = 0,2$; ++ $0,3 > \Delta OD > 0,4$; +++ $\Delta OD > 0,5$; ++++ $\Delta OD > 0,6$. ΔOD corresponde à diferença entre o valor de OD em 544 nm no tempo inicial de crescimento T0 e para o tempo T 196 horas (cerca de 8 dias).

Fonte de carbono a 1% (w/v) de Carboidrato em C6	<i>D. geothermalis</i>		<i>D. murrayi</i>					
	DRH05	DRH06	DRH07	DRH37	DRH38	DRH39	DRH08	DRH10
D-(+)-glicose	+++	+	++	++	+++	+++	+	+
D-(+)-celobiose	++	-	+++	+++	++	+++	++	-
Sucrose	+++	++	++	++	+++	+++	++	-
Amido	+++	++	++	++	+++	-	++	-
Carboidratos em C3:								
Glicerol	-	-	-	++	-	-	-	-
Piruvato de sódio	-	+	-	-	-	-	-	-

[0119]Tabela 3: Teste de assimilação das diferentes fontes de carbono em C5 e C6 realizados em várias espécies de *D. geothermalis* - $\Delta OD < 0,2$; $\Delta OD + = 0,2$; ++ $0,3 > \Delta OD >$

0,4; +++ 0,4 > ΔOD > 0,5; ++++ ΔOD > 0,6. ΔOD corresponde à diferença entre o valor do OD a 600 nm no tempo inicial de crescimento T0 e no momento T64 horas (aproximadamente 2,5 dias).

Fonte de carbono a 1% (w/v)	DRH05	DRH06	DRH07	DRH37	DRH38	DRH39
D-(+)-glicose	+++	++	+	++++	+++	+++
Xilan	+++	-	+	++++	++++	++++
Xilose	+++	++	++	++	+++	+++

Exemplo 5: Crescimento de bactérias em alta concentração de etanol

Material e Métodos

[0120]Este método permite a avaliação da capacidade de um microrganismo para se desenvolver na presença de uma elevada concentração de etanol. As bactérias testadas pertencentes às espécies *Deinococcus geothermalis*:

- Desenvolver entre 40 e 70 °C,
- Estão em operação entre pH3 e pH9,5
- são capazes de remontar, em parte ou na íntegra, a sua participação do genoma por um stress, nomeadamente através da irradiação, em especial por UV ou raios gama, por dissecação, pela ação da enzima, por ultra-som ou pelo estresse químico.

[0121]O teste deve ser realizado na temperatura ideal para o crescimento da cepa testada. A partir de uma pré-cultura fase estacionária em um meio de cultura enriquecido, para cada teor de etanol a ser testado, 20 ml de meio enriquecido é semeado em 1 % v/v. O meio de cultura enriquecido é composto de: peptona 1 g/l, extrato de levedura 5 g/l e glicose 10 g/l: solução esterilizada por autoclave (20 minutos, 120 °C). Para esta solução são adicionadas as seguintes soluções: tampão MOPS (10X) pH7 MOPS [tampão de ácido MOPS 400 mM, NH₄Cl 200 mM, NaOH 1000 mM, KOH 100 mM, CaCl₂ 5 μM, 2,76 mM Na₂SO₄, 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 em C₆H₅Na₃O₇ 20 mM; K₂HPO₄ 1 g/l: soluções esterilizadas por filtração (45μm).

[0122]O etanol é adicionado a T0, o conteúdo varia de 0 a 31%. Um acompanhamento de crescimento é realizado para cada conteúdo de álcool testado. OD é lido a 600 nm

utilizando um espectrofotômetro (Luz UV XS5, SECOMAM). Uma alíquota de 1 ml da cultura é tomada nos momentos: T0, T0 + 1 H, T0 + 3 H, T0 + 18 H, T0 + 20 H, T0 + 22 H, T0 + 24 H.

[0123]Quando for necessário para a leitura, a cultura é diluída a um décimo em meio enriquecido. As curvas de crescimento podem ser extraídas para cada conteúdo de álcool testado. No final do período de incubação e para cada conteúdo de etanol testado, a contagem é necessária para acessar a influência do etanol sobre a cepa.

Resultados

[0124]Algumas cepas testadas, tais como *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, são capazes de crescer em meio de cultura contendo etanol (ver Figura 5). Algumas cepas, tais como *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, mostram uma resistência em meios de cultura com alto teor de etanol (Figura 6A).

Exemplo 6: Produção de metabólitos de interesse por *Deinococcus murrayi*

Material e Métodos

[0125]Esse método permite a avaliação da capacidade de um microrganismo para produzir metabólitos de interesse (no grupo constituído por glicerol, butanodiol, propanodiol e ácidos acético, propiônico, butírico e pirúvico) proveniente da biomassa ou de um derivado de biomassa.

[0126]As bactérias testadas pertencentes às espécies geothermalis *Deinococcus*:

- se desenvolvem entre 40 e 70 °C,
- estão em operação entre pH 3 e pH 9.5,
- são capazes de remontar, em parte ou na íntegra, a sua separação do genoma por um stress, nomeadamente através da irradiação, em especial por raios UV ou gama, por dissecação, pela ação da enzima, por ultra-som ou pelo estresse químico.

[0127]O teste deve ser realizado à temperatura de crescimento ótima para a cepa testada. A partir de uma pré-cultura (em fase estacionária), preparada em meio de cultura enriquecido, 20 ml de meio enriquecido são semeados: semeadura em 1% v / v.

[0128]O meio de cultura enriquecido é composto de: peptona 2 g/l, extrato de levedura 5 g/l e glicose 10 g/l: solução esterilizada por autoclave (20 minutos, 120 °C). Para esta solução são adicionadas as seguintes soluções: solução-tampão de MOPS (10X) 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 em C₆H₅Na₃O₇ 20 mm; K₂HPO₄ 1 g/l: soluções esterilizadas por filtração (45 µm).

[0129]A cultura é deixada em uma incubadora, a 45 °C, sob agitação, até atingir a sua fase estacionária. Uma vez que a fase estacionária é alcançada, a cultura é centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante é derramado em outro tubo e é colocado a -80 °C. Uma análise de HPLC UV e refratometria (coluna de troca iônica (H⁺) Biorad, fase móvel de H₂SO₄ 5 mM, fluxo da fase móvel 0,6 ml/min, modo isocrático) permitem que os metabólitos de interesse sejam identificados.

Resultados

[0130]Algumas cepas testadas produzem alguns dos metabólitos de interesse procurado (Tabela 4).

[0131]Tabela 4: Os metabólitos produzidos por *Deinococcus murrayi* DSML 1305 (expressa em g / 1).

	GLICOSE	ÁCIDO ACÉTICO	ÁCIDO PROPIÔNICO	ÁCIDO PIRÚVICO
DRH10 CM	7,76	0,138	1,044	0,043

Exemplo 7: Crescimento do *Deinococcus geothermalis* em várias condições de pH

Material e Métodos

[0132]As cepas são cultivadas a 45 °C em meio PGY em pH diferente. O pH foi ajustado com 10% de NH₃ (v/v) ou HCl 10N. O crescimento é seguido por medição da densidade óptica a 600 nm utilizando uma leitora spectrostar OMEGA, BMG LabTech.

Resultado

[0133]Quatro cepas (*D. geothermalis*) foram capazes de se multiplicar em uma faixa de pH entre 5 e 8 (ver Figuras 6A, 6B, 6C e 6D).

[0134]Exemplo 8: Isolamento de bactérias termofílicas resistentes a UV proveniente de um ambiente natural

Tratamento das amostras de água quente

[0135]As amostras de água quente estão concentradas por filtração por um filtro de nitrocelulose de 0,22 µm (Millipore, França), em seguida, colocados em suspensão em 10 ml de água estéril. A solução filtrada é então sonicada por aproximadamente 60 segundos para ressuspender as bactérias.

Tratamento de amostras de madeira e pedra

[0136]As amostras de madeira e de pedra são imersas em água estéril e, em seguida, centrifugadas e sonicadas por aproximadamente 60 segundos.

Tratamento de amostras de pedras, musgos, líquenes, lama, sedimentos, biofilmes, do solo e dejetos de animais

[0137]As amostras de musgos, líquenes, lama, terra e dejetos dos animais são colocadas em suspensão em água estéril (V / V), em seguida, centrifugadas. As amostras são então sonicadas por aproximadamente 60 segundos.

Isolamento de bactérias termofílicas resistentes a UV

[0138]Seguinte à sonificação, entre 500 µl e 2 ml, as suspensões são espalhadas em um meio de cultura enriquecido de ágar PGY sólido esterilizado em autoclave (20 minutos, 120°C), que contém glicose (Sigma-Aldrich, França), 1 g/l, peptona (Fluka, França) 10 g/l e extrato de levedura (Fluka, França), 5 g/l. Os meios de cultura semeados, em seguida, submetidos a três tratamentos de UV utilizando um Biolink BLX-E254 (Vilber-Lourmat, França) de 4 de mJ/cm² cada, realizadas com um intervalo de 4 horas. Após incubação a 45°C por 3 a 4 dias, as colônias termofílicas de interesse são visíveis.

Exemplo 9: Digestão da celulose por *cellulosilyticus Deinococcus*

Material e Métodos

[0139]Uma pré-cultura de cepa D. *cellulosilyticus* foi realizada em um meio enriquecido (ver composição abaixo). A pré-cultura é utilizada para semear (1% v / v) 10 ml de meio

enriquecido, de meio mínimo contendo carboximetilcelulose (CM-celulose), ou o mesmo meio sem fonte de carbono.

[0140]Crescimento das bactérias foi realizado no 30 °C em 50 ml de tubos Falcon sob agitação (110 rpm), e seguido pela medição da densidade óptica a 600 nm com um espectrofotômetro (WPA Biowave, Cell density Meter).

[0141]Meio enriquecido: peptona 2 g/l, extrato de levedura 5 g/l; glicose 10 g/l, uma solução (pH7) contendo: 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; uma solução de micronutrientes (pH5): (NH₄)₆(MO₇)₂₄ 3 nM, H₃BO₃ 400 nm, CoCl₂ 30 nM, 10 nM CuSO₄, MnCl₂ 250 nM, 10 nM ZnSO₄; uma solução de vitaminas, pH4, (1 mg/l de cada): D-biotin, niacina, piridoxina-HCl, tiamina-HCl, vitamina B12, uma fonte de fosfato: K₂HPO₄ 5,7 mM; FeCl₃ 20 mM.

[0142]Médio mínimo: uma solução (pH7) contendo: ácido MOPS 40 mM, NH₄Cl 20 mM, KOH 10 mM, NaOH 10 mM, 0,5 mM CaCl₂, Na₂SO₄ 0,276 mM, MgCl₂ 0,528 mM; uma solução de micronutrientes (pH5): (NH₄)₆(MO₇)₂₄ 3 nM, H₃BO₃ 400 nM, CoCl₂ 30 nM, CuSO₄ 10 nM, MnCl₂ 250 nM, ZnSO₄ 10 nM; uma solução de vitaminas, pH4 (1 μg /l de cada): D-biotin, niacina, piridoxal-HCl, tiamina-HCl, vitamina B 12, uma fonte de fosfato: K₂HPO₄ 5,7 mM, FeCl₃ 20 μM.

Resultado

[0143]Foi demonstrado que a cepa *D. cellulosityticus* relacionada com DSMZ sob o número DSM 18568^T (Weon et al, 2007) possui uma atividade de CM-celulose (Weon et al. 2007 international journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 1685-1688).

[0144]Como é mostrado na Figura 7, *D. cellulosityticus* é capaz de se multiplicar em um meio contendo celulose CM como a única fonte de carbono, a variação na densidade óptica a 600 nm após 10 dias de crescimento neste meio foi significativa ($\Delta DO_{600nm} = 0,5$) em comparação com a cultura de controle (sem meio de fonte de carbono; ($\Delta DO_{600nm} = 0,18$)). Este resultado indicou que *D. cellulosityticus* não só é capaz de degradar (Depolymerise) CM-celulose, mas também capaz de assimilar os produtos derivados desta degradação (celobiose

e glicose).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um biocombustível, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) cultivar e/ou desenvolver uma bactéria do gênero *Deinococcus* em condições aeróbicas e/ou anaeróbicas,

b) modificar uma biomassa vegetal ou derivados de biomassa vegetal em um biocombustível utilizando uma composição que compreende a dita bactéria, e

c) coletar o dito biocombustível resultante da dita modificação de biomassa vegetal ou de derivados da biomassa vegetal.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as etapas a), b) e c) são realizadas simultaneamente ou sequencialmente.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a biomassa vegetal é madeira e resíduos de madeira, resíduos florestais, resíduos industriais, culturas agrícolas, resíduos agrícolas, plantas comestíveis e/ou não-comestíveis ou partes das mesmas, palha, resíduos de jardim, plantas aquáticas, resíduos animais, resíduos de operação de gados, esterco, resíduos orgânicos municipais e/ou resíduos orgânicos industriais.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os derivados de biomassa vegetal são lignina, celulose, hemicelulose, xilana, glucuronoxilana, arabinoxilana, glucomannan, xiloglucano, amido, sacarose, lactose, maltose, trealose, glicose, xilose, manose, arabinose, ramnose, galactose e/ou frutose.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita bactéria é viável na presença de

agentes tóxicos, em particular na presença de solventes orgânicos, por exemplo, o etanol.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita bactéria é cultivada em uma faixa de temperatura de 40 a 70 °C.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita bactéria é viável ou utilizada em um intervalo de pH entre 3 e 9,5.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita bactéria *Deinococcus* é capaz de converter os açúcares C6 e/ou C5 e/ou promover a digestão da celulose para gerar glicose e/ou promover a digestão da hemicelulose para gerar xilose.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita bactéria é selecionada a partir de *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus murrayi* e *Deinococcus cellulosilyticus*.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita bactéria é selecionada a partir das cepas de *Deinococcus geothermalis* com depósito no. DSM11300, DSM11301, DSM11302, HAMB12480, HAMB12481, HAMB12411 ou cepas de *Deinococcus murrayi* com depósito no. DSM11303, DSM11305 ou cepas de *Deinococcus cellulosilyticus* com depósito no. DSM18568T.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita composição ainda compreende um ou mais agentes antiespumantes e/ou agentes nutrientes.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11,

CARACTERIZADO pelo fato de que um reator de conversão de biomassa é empregado.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para a produção de etanol, propanol, butanol, glicerol, butanodiol ou propanodiol.

14. Uso de uma bactéria do gênero *Deinococcus*, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para a produção de um biocombustível a partir de biomassa vegetal ou de derivados de biomassa vegetal.

FIGURA 1

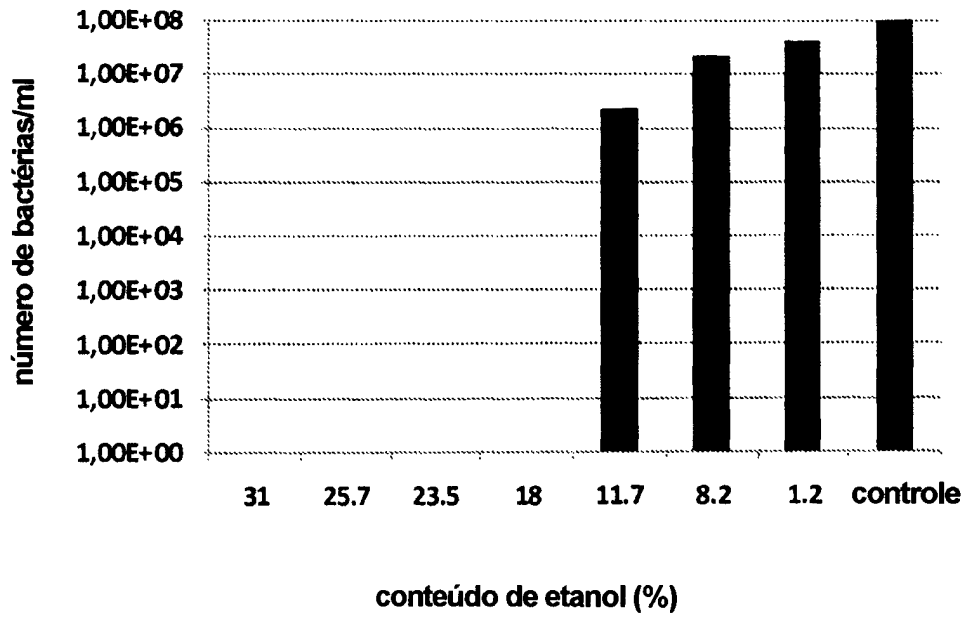


FIGURA 2

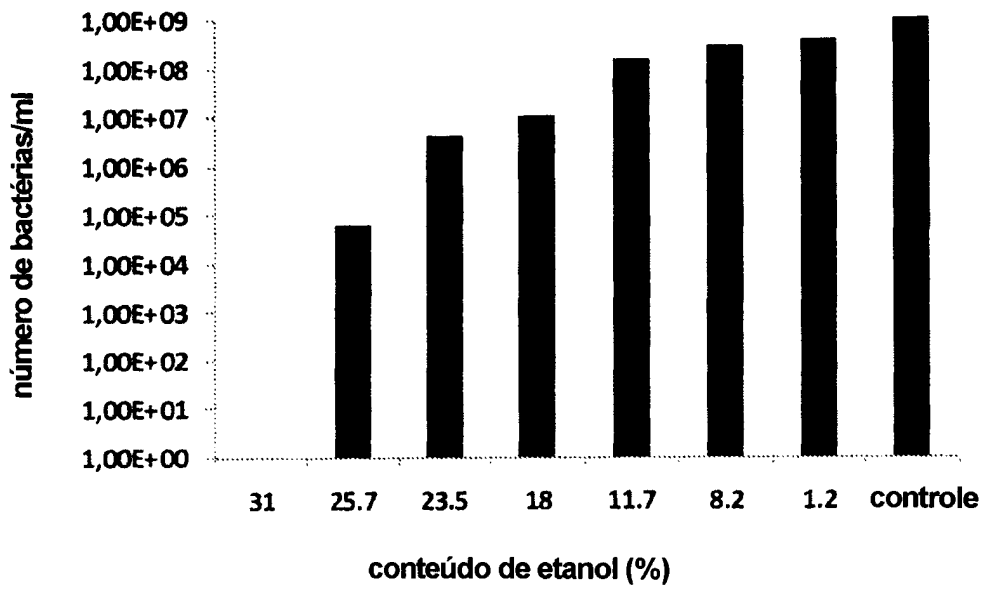


FIGURA 3

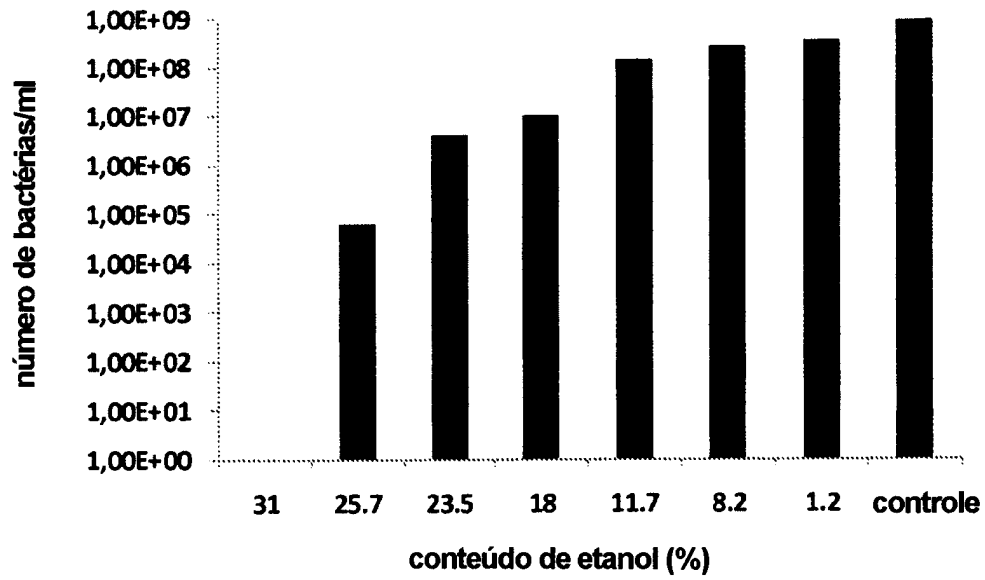


FIGURA 4

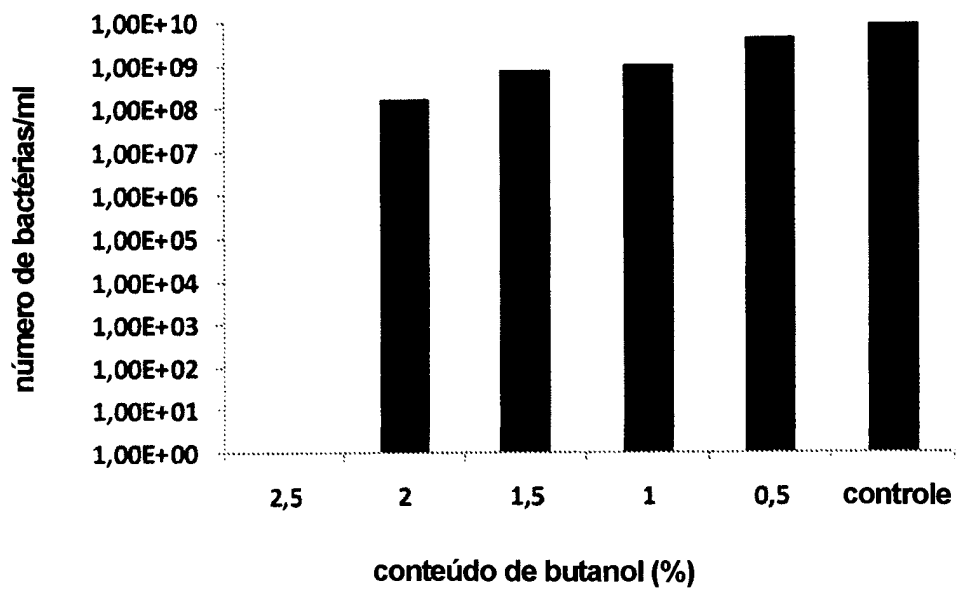


FIGURA 5

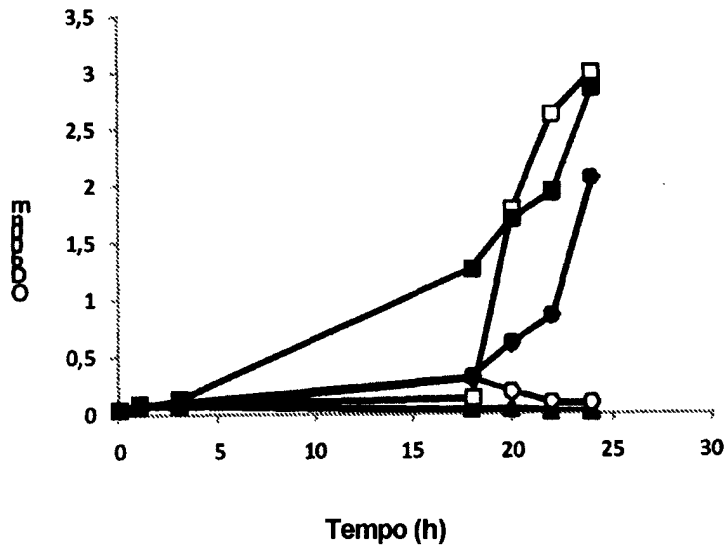


FIGURA 6

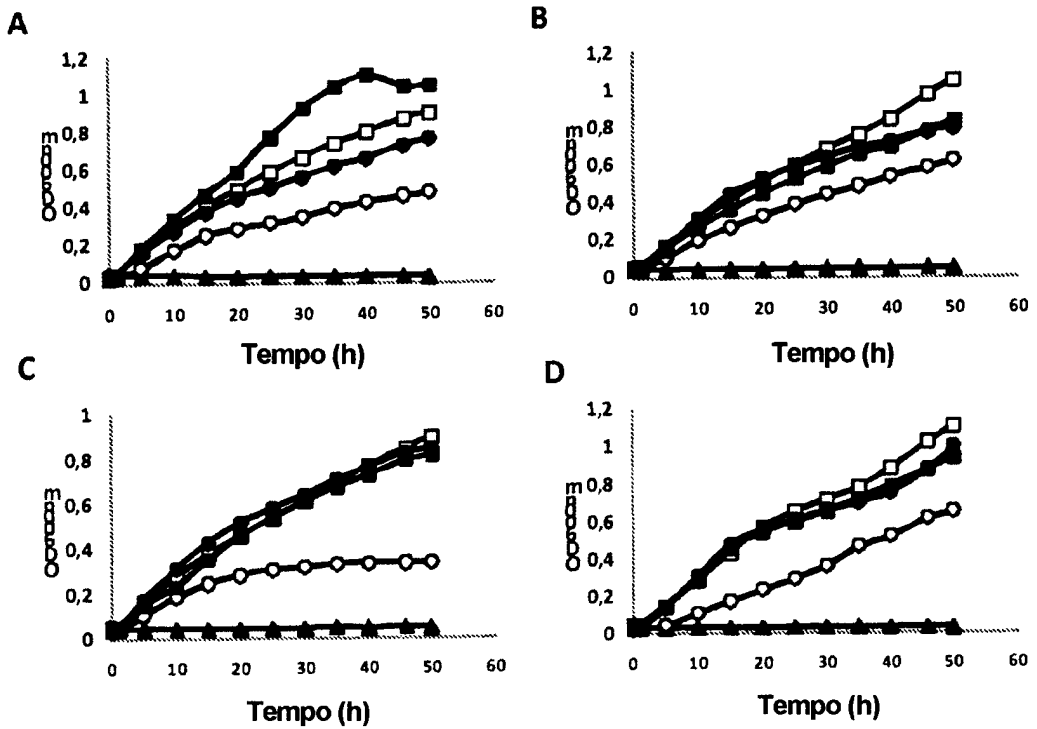


FIGURA 7

