

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 672**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2010 PCT/EP2010/051885**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO10094665**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2010 E 10703889 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2398891**

54 Título: **Composiciones y métodos para degradar biomasa lignocelulósica**

30 Prioridad:

17.02.2009 EP 09305154
18.02.2009 US 153478 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2018

73 Titular/es:

DEINOVE (33.3%)
Cap Sigma - ZAC Euromédecine II, 1682 rue de la
Valsière
34790 Grabels, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)

72 Inventor/es:

ISOP, CATHY;
JOSEPH, PASCALE;
LEONETTI, JEAN-PAUL y
BITON, JACQUES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 660 672 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

Composiciones y métodos para degradar biomasa lignocelulósica

5 La presente invención describe una composición y métodos para producir metabolitos y productos bioenergéticos de interés industrial a partir de una biomasa lignocelulósica. De modo más específico, la invención describe la identificación, la caracterización y el aislamiento de nuevas bacterias que tienen la notable capacidad de transformar una biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables y, de modo aún más notable, en metabolitos y productos bioenergéticos. La invención se refiere a un método para aislar dichas bacterias. También se describen composiciones que comprenden dichas bacterias y sus usos para la modificación de una biomasa lignocelulósica, con el objetivo de producir bioenergía.

10 **Antecedentes**

La conversión de biomasa lignocelulósicas ha sido el objeto de intensos trabajos de investigación desde la década de 1970 (Blumer-Schuetz *et al.*, 2008, *Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects*, *Curr Opin Biotechnol.*, 19, pp. 210-217; Pérez *et al.*, 2002, *Int. Microbiol.*, 5, pp. 53-63).

15 A este respecto, se conoce el uso de microorganismos para realizar la modificación de biomasa transformada, fundamentalmente materias primas agrícolas pretratadas, para producir productos bioenergéticos, tales como el etanol. Sin embargo, tal como se indica en Mosier *et al.* (*Bioresource Technology*, 96 (2005), 673-686), es necesario el pretratamiento de una biomasa lignocelulósica para alterar la estructura de la biomasa celulósica para que la celulosa sea más accesible a las enzimas que convierten los polímeros de carbohidratos en azúcares fermentables.

20 Sin embargo, se cree que los futuros biocombustibles o productos bioenergéticos surgirán de biomasa lignocelulósicas brutas, en lugar de materias primas agrícolas pretratadas. El uso de dichas biomasa brutas requerirá un método eficaz de degradación (por ejemplo, hidrólisis) de la biomasa lignocelulósica para producir azúcares fermentables que, a su vez, puedan transformarse a través de una fermentación en productos bioenergéticos (por ejemplo, alcoholes y otros metabolitos de valor industrial). Por tanto, la producción de azúcares fermentables (por ejemplo, azúcares monoméricos) a partir de una biomasa lignocelulósica bruta es un desafío importante, y a este respecto se han propuesto diversas estrategias, tales como métodos termoquímicos, hidrólisis con ácidos e hidrólisis enzimática.

25 Sin embargo, debido a la amplia gama de biomasa lignocelulósicas que se están considerando (cada una con una composición específica de celulosa, hemicelulosa y lignina), el desarrollo de enzimas o de composiciones enzimáticas para la hidrólisis de dicha biomasa bruta no parece ser barato. Además, los subproductos de la lignina que permanecen tras estos tratamientos de la biomasa lignocelulósica en general no son modificados y se pierden.

30 El documento WO2009/063079 describe el uso de bacterias del género *Deinococcus* para la producción de metabolitos y productos bioenergéticos a través de la fermentación de biomasa.

35 Taryn *et al.* (*ABB*, 45 (1994), 209) mencionan la capacidad de bacterias del género *Clostridium* para degradar azúcares fermentables.

El documento WO97/10352 se refiere a cepas bacterianas de *Pseudomonas* que degradan la celulosa. De modo similar, Weon *et al.* (*Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology* (2007), 57, pp. 1685-1688) describen cepas de *Deinococcus* resistentes a UV que hidrolizan la celulosa.

40 W. Zimmermann (*Journal of Biotechnology*, 13 (1990), 119-130) proporciona un informe acerca de la degradación bacteriana de la lignina.

Se describe el aislamiento de bacterias resistentes a la radiación procedentes de una muestra que contiene bacterias no caracterizadas, por ejemplo, en Fernández Zenoff *et al.* (*Current Microbiology*, 52 (2006), 359-362).

45 Nunca se ha informado acerca de bacterias que tengan la capacidad de hidrolizar los constituyentes principales de una biomasa lignocelulósica, que incluyen la lignina, el xilano y la celulosa, bajo condiciones adecuadas para un proceso industrial. En particular, nunca se han aislado bacterias que puedan degradar la lignina bajo condiciones industriales.

Por consiguiente, existe una necesidad no cubierta de un proceso barato y escalable para la degradación de una biomasa lignocelulósica para producir productos valiosos, tales como azúcares fermentables o metabolitos y productos bioenergéticos.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere al contenido de las reivindicaciones.

- La presente solicitud describe composiciones y métodos para producir productos valiosos a partir de una biomasa lignocelulósica o sus derivados. De modo más específico, la invención se refiere a nuevas bacterias que tienen la capacidad de transformar una biomasa lignocelulósica, o sus derivados, en productos valiosos, que incluyen azúcares fermentables y productos bioenergéticos. La solicitud también describe métodos para producir productos y metabolitos valiosos empleando dichas bacterias.
- 5
- La invención surge, entre otros puntos, de la identificación de microorganismos que tienen las propiedades inesperadas y notables de transformar una biomasa lignocelulósica, o sus derivados, con el objetivo de obtener compuestos que pueden utilizarse para producir bioenergía, en particular etanol, a una escala industrial y de modo barato y fiable.
- 10 A este respecto, la invención surge del diseño de un método mejorado para seleccionar o identificar bacterias a partir de cualquier muestra. Más en concreto, la presente invención describe un método para seleccionar o identificar o aislar una bacteria, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
- a) proporcionar una muestra que comprende bacterias;
- b) someter la muestra a un tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula; y
- 15 c) seleccionar o aislar, a partir de dicha muestra tratada, una bacteria que tiene la capacidad de vivir o crecer en presencia de lignina, celulosa o xilano como fuente de carbono, por ejemplo, de usar lignina, celulosa o xilano como fuente de carbono.
- La presente solicitud también describe una bacteria que puede obtenerse mediante dicho método o un extracto de dicha bacteria.
- 20 Siguiendo el método anterior, los inventores han logrado aislar e identificar, a partir de materias primas, nuevos microorganismos que tienen la inesperada capacidad de hidrolizar los tres componentes principales de la biomasa lignocelulósica, es decir, la celulosa, el xilano y la lignina.
- Este nuevo descubrimiento de que un microorganismo es capaz de transformar una materia prima que contiene lignina para la producción de productos bioenergéticos representa un gran adelanto tecnológico, ya que permite lograr un proceso de una sola etapa de producción de productos energéticos (por ejemplo, etanol) a partir de una biomasa bruta (biomasa lignocelulósica), que soluciona los inconvenientes previos de emplear materias primas agrícolas pretratadas en lugar de una biomasa lignocelulósica bruta. Además, las mismas bacterias descritas en la presente pueden emplearse a lo largo del proceso de producción completo, es decir, para hidrolizar la biomasa lignocelulósica y para producir productos bioenergéticos mediante fermentación a través de un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF).
- 25
- 30 La presente solicitud describe por tanto una bacteria aislada, en la que dicha bacteria tiene la capacidad de crecer en presencia de lignina o celulosa o xilano como fuente de carbono, a una temperatura de 30 °C o mayor, y de resistir a un tratamiento con UV de 4 mJ/cm².
- La presente solicitud describe una bacteria aislada, en la que dicha bacteria tiene la capacidad de crecer en presencia de lignina como única fuente de carbono, a una temperatura de 30 °C o mayor, y de resistir a un tratamiento con UV de 4 mJ/cm².
- 35
- La presente solicitud describe una bacteria aislada, en la que dicha bacteria tiene la capacidad de utilizar la celulosa y el xilano como fuente de carbono, a una temperatura de 30 °C o mayor, y de resistir a un tratamiento con UV de 4 mJ/cm².
- 40 Preferiblemente, la bacteria de la presente invención tiene la notable capacidad de emplear lignina, celulosa y xilano como fuente de carbono. En efecto, la invención demuestra que pueden identificarse y cultivarse bacterias que tienen la capacidad de degradar todos los constituyentes principales de biomasa lignocelulósicas. Estas bacterias pueden emplearse para transformar dichas biomasa con una eficacia sin precedentes.
- 45 En particular, las bacterias descritas en la presente pueden hacerse crecer o cultivarse en condiciones aerobias y anaerobias. En efecto, la solicitud ha demostrado, de modo inesperado, que las bacterias descritas en la presente pueden operar en condiciones, tales como condiciones anaerobias, adecuadas para producir grandes cantidades de metabolitos o productos bioenergéticos a partir de diversos sustratos.
- Las bacterias descritas en la presente pueden contener una molécula de ácido nucleico exógeno.
- 50 Las bacterias descritas en la presente, en un aspecto preferido, pertenecen a un género seleccionado de *Deinococcus*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Methylobacterium*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Caldimonas*, *Paenibacillus*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingobium*, *Sphingopyxis*, o *Porphyrobacter*.

Tal como se ilustra en los ejemplos, las bacterias de los anteriores géneros, que pueden identificarse y cultivarse, son capaces de transformar una biomasa y de resistir a un tratamiento con UV destructor de células de 4 mJ/cm^2 . Estas bacterias representan un medio valioso para convertir una biomasa, que incluye una biomasa lignocelulósica, en productos muy valiosos.

5 La presente solicitud también describe una composición que comprende una bacteria descrita en la presente y un medio de cultivo.

La presente solicitud también describe un extracto de una bacteria, tal como se describió anteriormente.

10 La presente solicitud también describe el uso de una bacteria descrita en la presente, o un extracto de esta, para hidrolizar una biomasa lignocelulósica, o para convertir o transformar una biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables.

La presente solicitud también describe un método para degradar o convertir una biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables, comprendiendo dicho método una etapa de exponer una biomasa lignocelulósica a una bacteria descrita en la presente, o a un extracto de esta.

15 La presente solicitud también describe un método para producir azúcares fermentables a partir de una biomasa lignocelulósica, comprendiendo dicho método una etapa de exponer una biomasa lignocelulósica a una bacteria descrita en la presente, o a un extracto de esta.

20 Los anteriores métodos pueden realizarse bajo condiciones aerobias y/o anaerobias, a temperaturas elevadas (por ejemplo, de al menos $30 \text{ }^\circ\text{C}$ o mayor), y permiten la transformación eficaz de todos los tipos de constituyentes principales de una biomasa lignocelulósica. Además, en una realización particular, los métodos descritos en la presente comprenden otra etapa de recolectar los azúcares fermentables o de transformar los azúcares fermentables en metabolitos o productos bioenergéticos. Dicha etapa de transformación (fermentación) puede realizarse empleando una bacteria descrita en la presente o una bacteria distinta, o una combinación de bacterias o sus extractos.

25 Preferiblemente, tanto la hidrólisis como la fermentación se realizan empleando una bacteria descrita en la presente, lo más preferiblemente la misma bacteria. En efecto, en un aspecto preferido, la presente solicitud describe la producción de productos bioenergéticos directamente a partir de una biomasa lignocelulósica permitiendo la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica y la fermentación de los azúcares.

La presente solicitud también describe el uso de una bacteria descrita en la presente para producir metabolitos o productos bioenergéticos.

30 La presente solicitud también describe un método para producir un metabolito o un producto bioenergético, comprendiendo dicho método exponer una biomasa lignocelulósica a una bacteria descrita en la presente, o a un extracto de esta, y recuperar el metabolito o producto bioenergético obtenido.

35 Preferiblemente, tanto la hidrólisis como la fermentación se realizan empleando una bacteria descrita en la presente, lo más preferiblemente la misma bacteria. Debe advertirse que, como alternativa, pueden emplearse dos o más bacterias distintas, de modo secuencial o en combinación, para producir productos bioenergéticos a partir de una biomasa lignocelulósica.

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

- proporcionar (o cultivar y/o hacer crecer) una bacteria descrita en la presente, o un extracto de esta,
- 40 - modificar una biomasa lignocelulósica, o uno de sus derivados, para producir metabolitos o productos bioenergéticos de interés industrial (por ejemplo, fuentes bioenergéticas, tales como etanol, componentes constitutivos químicos, tales como ácido succínico) empleando dicha bacteria, o un extracto de esta, y
- recolectar al menos un metabolito o producto bioenergético que resulta de dicha modificación.

La presente solicitud también describe una composición que comprende una bacteria, según se definió anteriormente, y una biomasa lignocelulósica o un derivado de esta.

45 La presente solicitud también describe metabolitos o productos bioenergéticos producidos empleando un método tal como se describió anteriormente.

La presente solicitud también describe un reactor o un fermentador que comprende una biomasa lignocelulósica y una bacteria de esta invención.

50

Leyenda de las figuras

Figura 1: Resultados de crecimiento de bacterias termófilas resistentes a UV en MM + CMC al 1% en condiciones de anaerobiosis.

5 Figura 2: Resultados de crecimiento de bacterias termófilas resistentes a UV en MM + xilano al 1% en condiciones de anaerobiosis.

Figura 3: Resultados de crecimiento de aislados rosas resistentes a UV en MM + lignina al 0,1% en condiciones de anaerobiosis a 30 °C después de 5 días. Se perfilan los aislado M10-1D y M10-1E, que son capaces de emplear la lignina como única fuente de carbono, y M10-8D, que es capaz de degradar la lignina.

Figura 4: La cepa DRH46 de *Deinococcus* es capaz de degradar papel de periódico.

10 Descripción detallada de la invención

La invención describe la identificación, la caracterización y el aislamiento de nuevas bacterias que tienen la notable capacidad de transformar una biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables y, de modo aún más notable, en metabolitos y productos bioenergéticos. La invención también describe un método para aislar dichas bacterias, composiciones que comprenden dichas bacterias y sus usos para la modificación de una biomasa lignocelulósica, con el objetivo de producir metabolitos y productos bioenergéticos.

Definiciones

La expresión biomasa lignocelulósica, según la invención, indica una biomasa bruta que contiene lignina, celulosa y/o xilano. Por tanto, la expresión biomasa lignocelulósica fundamentalmente indica un material no procesado de origen biológico, tal como productos forestales, que incluyen árboles maduros que no son adecuados para la producción de papel o madera, productos agrícolas, tales como plantas herbáceas, cultivos y estiércol animal, y productos acuáticos, tales como algas. Las fuentes específicas de biomasa incluyen, sin limitación, tallos de madera dura o madera blanda, mazorcas de maíz, paja de trigo, plantas herbáceas, hojas, semillas, papel, etc. (véase, por ejemplo, Sun *et al.*, Bioresource Technology, 83 (2002), 1-11). La expresión biomasa lignocelulósica debe distinguirse de la biomasa transformada o biomasa secundaria, que contiene fundamentalmente productos de biomasa pretratados hidrolizados.

Los ejemplos de biomasa lignocelulósicas incluyen madera o material vegetal derivado de numerosos tipos de plantas, que incluyen *Miscanthus*, cáñamo, remolacha azucarera, trigo, maíz, álamo, sauce, sorgo, caña de azúcar y una diversidad de especies arbóreas, que varían desde el eucalipto a la palma de aceite.

30 Tal como se emplea en la presente, la expresión “derivados de biomasa” indica una composición que comprende moléculas que proceden de una biomasa lignocelulósica, tales como lignina, celulosa, hemicelulosa.

En el contexto de la presente solicitud, el término bacteria incluye cepas de tipo salvaje o variantes naturales de una bacteria, por ejemplo, cepas obtenidas mediante evolución acelerada, mediante técnicas de reordenación del ADN, o cepas recombinantes obtenidas mediante la inserción de un ácido nucleico eucariota, procariota y/o sintético.

35 Un “extracto de una bacteria” indica cualquier fracción obtenida de una bacteria, tal como un sobrenadante de células, residuos de células, paredes celulares, un extracto de ADN, enzimas o una preparación de enzimas o cualquier preparación obtenida de una bacteria mediante un tratamiento químico, físico y/o enzimático, que está fundamentalmente exenta de bacterias vivas. Un extracto de bacterias preferiblemente conserva la actividad enzimática de las bacterias, lo más preferiblemente la capacidad de hidrolizar una biomasa lignocelulósica.

40 Dentro del contexto de la presente invención, el término “bioenergía” indica una energía renovable derivada de una biomasa. De modo más específico, la expresión “productos bioenergéticos” incluye los “biocombustibles” y todos los productos finales de la modificación de una biomasa o de derivados de biomasa que pueden emplearse como combustible, tales como etanol, propanol, butanol glicerol, butandiol y propandiol.

45 El término “metabolitos” indica todas las posibles moléculas intermedias generadas durante la modificación de la biomasa o de los derivados de biomasa para producir productos bioenergéticos que incluyen, pero no se limitan a varios productos químicos de interés industrial, tales como ácidos orgánicos y componentes constituyentes, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido butírico, ácido láctico y/o ácido succínico.

50 La presente solicitud describe una composición y métodos para producir bioenergía a partir de una biomasa lignocelulósica o derivados de biomasa lignocelulósicas. De modo más específico, la solicitud describe el uso de bacterias para la modificación de una biomasa lignocelulósica, con el objetivo de producir metabolitos y productos bioenergéticos.

La invención demuestra, por primera vez, que pueden aislarse bacterias de fuentes ambientales que son capaces de producir metabolitos o productos bioenergéticos a partir de una biomasa lignocelulósica.

A este respecto, un objeto de esta invención consiste en un método para aislar o identificar bacterias, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una muestra que comprende bacterias;

b) someter la muestra a un tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula; y

5 c) aislar, a partir de dicha muestra tratada, una bacteria que tiene la capacidad de vivir o crecer en presencia de lignina, celulosa o xilano como fuente de carbono.

10 El método puede ejecutarse con diversas muestras que comprenden bacterias no caracterizadas, en particular con muestras que son o que se derivan de una muestra ambiental. Dentro del contexto de esta invención, las muestras ambientales incluyen cualquier muestra que contiene (una pluralidad de) (micro)organismos no caracterizados, en particular microorganismos no cultivados (por ejemplo, microorganismos que no se han expresamente cultivados y expandidos en forma aislada). La muestra puede obtenerse o derivarse de entornos naturales o de entornos artificiales o creados específicamente.

15 Tal como se ha indicado, la muestra puede ser cualquier muestra ambiental, tales como las obtenidas o derivadas de tierra, agua, extractos vegetales, material biológico, sedimentos, tierra turbosa, efluentes o sitios industriales, extractos minerales, arena y similares. La muestra puede recolectarse de diversas regiones o condiciones, tales como, pero sin limitarse a regiones tropicales, regiones volcánicas, bosques, granjas, áreas industriales, etc. La muestra contiene habitualmente diversas especies de microorganismos (no caracterizados, no cultivados), tales como microorganismos terrestres, microorganismos marinos, microorganismos de agua dulce, microorganismos simbióticos, etc. Las especies de dichos microorganismos ambientales incluyen bacterias, algas, hongos, levaduras, mohos, virus, etc. Los microorganismos pueden incluir organismos extremófilos, tales como, por ejemplo, termófilos. La muestra comprende habitualmente diversas especies de dichos microorganismos (no cultivados), así como diversas cantidades de estos. Además, la muestra puede contener también microorganismos conocidos y/o cultivables (por ejemplo, procariotas o eucariotas).

25 Se entenderá que la presente invención no está limitada a ningún tipo de muestra o microorganismo ambiental específico, sino que puede ejecutarse usando cualquier muestra que comprenda microorganismos no cultivados.

En una realización preferida, la muestra es o se deriva de tierra, agua, fuentes termales, entornos marinos, barro, madera, piedra, musgo, extractos vegetales, líquen, material biológico, sedimentos, biopelículas, efluentes industriales, gases, arena, petróleo, aguas residuales o deposiciones animales o humanas.

30 Para su uso en la presente invención, la muestra puede estar húmeda, ser soluble, estar seca, en forma de una suspensión, una pasta, etc. Además, antes de la etapa b) del método, la muestra puede tratarse para mejorar el proceso, por ejemplo, para enriquecerla en microorganismos, por ejemplo, tal como mediante filtración, lavados, concentración, dilución, dirección, secado, etc.

En una realización concreta, la muestra está en forma de una suspensión filtrada. Más en concreto, la muestra puede esterilizarse mediante filtración y/o colocarse en agua estéril antes de la etapa de tratamiento b).

35 La etapa b) del proceso comprende someter la muestra (es decir, los microorganismos contenidos en la muestra) a un tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula.

40 El tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula indica un tratamiento que provoca una muerte sustancial de células en la muestra, a diferencia de los meros tratamientos mutagénicos que introducen modificaciones en el ADN. En particular, el tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula es un tratamiento que es suficiente para provocar 90% o más de muerte celular en un cultivo de bacterias de *E. coli*. En la presente, el tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula es un tratamiento que es suficiente para reducir en al menos 2 log la titulación bacteriana en un cultivo de *E. coli*. De modo sorprendente, la invención demuestra que dicho tratamiento, que normalmente sería mortal para la mayoría de las poblaciones de células, permite el aislamiento eficaz y rápido de nuevos microorganismos a partir de diversos tipos de muestras, y estos microorganismos tienen propiedades inesperadas. Este resultado resulta particularmente sorprendente, puesto que se esperaría que someter los microorganismos a dicho tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula evitaría el aislamiento de microorganismos vivos.

45 El tratamiento para provocar daños en el ADN puede comprender someter la muestra una o más irradiaciones y/o a uno o varios agente genotóxicos. El tratamiento se realiza bajo condiciones y/o durante un periodo de tiempo suficiente para inducir una muerte sustancial de las células de microorganismos presentes en la muestra.

50 En una realización concreta, el tratamiento para provocar daños en el ADN comprende someter la muestra a una o varias irradiaciones. Un tratamiento preferido comprende someter la muestra (concretamente, los microorganismos en la muestra) a un tratamiento de irradiación secuencial repetido.

La irradiación puede seleccionarse de irradiación con rayos UV, rayos gamma y/o rayos X, solos o en

combinaciones, lo más preferiblemente a una o más irradiaciones UV. El tratamiento de irradiación generalmente comprende someter los microorganismos a una o varias irradiaciones secuenciales (por ejemplo, de 1 a 5), que pueden ser de naturaleza idéntica o diferente, preferiblemente de naturaleza idéntica.

5 Un tratamiento particularmente preferido comprende someter la muestra a una irradiación con UV que destruye la célula. En efecto, la invención demuestra que este tratamiento permite aislar con alta eficacia a partir de muestras ambientales (por ejemplo, tierra o agua) especies bacterianas infrarrepresentadas que tienen unas actividades enzimáticas notables. Los tratamientos con UV que destruyen las células generalmente se realizan de entre 0,5 y 400 mJ/cm², más preferiblemente de entre 1 y 200 mJ/cm², y generalmente de entre 1 y 100 mJ/cm². Un tratamiento con UV preferido se realiza a 4 mJ/cm². Los tratamientos de irradiación repetida generalmente se realizan en un intervalo de entre 1 y 8 horas, preferiblemente de 3 a 5 horas, y lo más preferiblemente de aproximadamente 4 horas.

15 En una realización específica, el tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula comprende someter la muestra al menos a 2, preferiblemente al menos a 3 tratamientos con UV de entre 0,5 y 400 mJ/cm² cada uno, preferiblemente de aproximadamente 4 mJ/cm² cada uno, realizados en un intervalo de entre 1 y 8 horas, preferiblemente de 3 a 5 horas, y más preferiblemente de aproximadamente 4 horas.

En un método alternativo descrito, el tratamiento para provocar daños en el ADN que destruye la célula comprende poner en contacto la muestra con un agente genotóxico, tal como un disolvente, mitomicina o H₂O₂. Debe entenderse que los agentes genotóxicos también pueden utilizarse en combinación con la irradiación.

20 Durante la fase de tratamiento, la muestra preferiblemente se coloca en un medio de cultivo adecuado, tal como, sin limitación, PGY (bacto-peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, glucosa 1 g/l) o LB (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, cloruro de sodio 10 g/l). Debe entenderse que los expertos en la técnica conocen otros medios de cultivo adecuados (Buchanan *et al.*, 1974, Difco, 1995) o estos pueden ser preparados por los expertos en la técnica a partir de dichos medios conocidos.

25 La etapa de tratamiento b) generalmente se realiza en un medio de cultivo sólido o semisólido, tal como en presencia de un gel (por ejemplo, agar). El medio de tratamiento más preferido comprende un medio de cultivo de agar, tal como un medio de cultivo de agar blando. En una realización concreta se emplea un medio de agar PGY para cultivar las bacterias. Sin embargo, también pueden emplearse diferentes medios sólidos que contengan una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales. También pueden emplearse técnicas de dilución en serie según Schoenborn *et al.* (2004).

30 En la etapa c), se identifican o se aíslan bacterias vivas o en crecimiento a partir de la muestra tratada. Las bacterias vivas o en crecimiento pueden identificarse mediante diferentes medios conocidos *per se* en la técnica. En una realización concreta, se identifican las colonias que se forman en el medio de cultivo. Las bacterias vivas o en crecimiento pueden aislarse y colocarse en medio fresco para un posterior cultivo o expansión.

35 En una realización preferida, las bacterias en la etapa b) se cultivan en medio mínimo que comprende, como única fuente de carbono, lignina (preferiblemente al 0,05-3% en peso), celulosa (preferiblemente al 0,5-3% en peso) y/o xilano (preferiblemente al 0,5-3% en peso). La lignina, la celulosa y el xilano pueden obtenerse de fuentes comerciales (lignina: Sigma, Francia; CMC y xilano: Fluka, Francia). En los ejemplos se proporcionan fuentes de medio mínimo. Pueden emplearse otros medios mínimos tal como se ha descrito previamente (Rainey, F. A., *et al.*, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (9):5225-5235; Ferreira, A. C., *et al.*, 1997, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(4):939-947; Kongpol A. *et al.*, 2008, *FEMS Microbiol. Lett.*, 286(2):227-235).

45 Los métodos de esta invención pueden comprender una o varias etapas adicionales de seleccionar las bacterias que tienen propiedades concretas. Más en particular, en una realización preferida, el método comprende además una o varias etapas de seleccionar las bacterias que son viables o crecen bajo condiciones de cultivo seleccionadas, tales como medio, temperatura, pH, salinidad, nutrientes, oxigenación o fuente de carbono. Para este fin, la muestra o las bacterias pueden colocarse bajo condiciones de selección apropiadas durante una cualquiera de las etapas b), o c), o durante una etapa anterior o posterior, y la propiedad resultante se selecciona durante cualquiera de estas etapas.

50 En un aspecto concreto de la presente invención, las bacterias se cultivan bajo unas condiciones de temperatura concretas para identificar o aislar bacterias que son viables o que pueden crecer en un intervalo de temperatura de aproximadamente 4 a 70 °C. Más en concreto, las bacterias se mantienen a la temperatura seleccionada durante la etapa b) y/o c) y/o durante una etapa adicional, para identificar o aislar las bacterias que son viables o que pueden cultivarse a la temperatura deseada.

55 En otro aspecto concreto de la presente invención, las bacterias se cultivan bajo unas condiciones salinas concretas para identificar o aislar bacterias que son viables o que pueden crecer bajo unas condiciones de concentración de NaCl o sales equivalentes que pueden alcanzar aproximadamente 5% en peso/volumen. Más en concreto, las bacterias se mantienen en la salinidad seleccionada durante la etapa b) y/o c) y/o durante una etapa adicional, para identificar o aislar las bacterias que son viables o que pueden cultivarse a la salinidad deseada.

En otra realización concreta y preferida de la presente invención, las bacterias se cultivan bajo unas condiciones de

pH concretas para identificar o aislar bacterias que son viables o que pueden crecer en un intervalo de pH de entre aproximadamente 3 y 9,5, preferiblemente entre 4 y 8. Más en concreto, las bacterias se mantienen al pH seleccionado durante la etapa b) y/o c) y/o durante una etapa adicional, para identificar o aislar las bacterias que son viables o que pueden cultivarse al pH deseado.

- 5 En otra realización concreta de la presente invención, las bacterias se cultivan bajo unas condiciones de oxigenación concretas para identificar o aislar bacterias que son viables o que pueden crecer en condiciones aerobias y/o anaerobias. Más en concreto, las bacterias se mantienen bajo las condiciones de oxigenación seleccionadas durante la etapa b) y/o c) y/o durante una etapa adicional, para identificar o aislar las bacterias que son viables o que pueden cultivarse en las condiciones deseadas.
- 10 En otra realización concreta de la presente invención, las bacterias se cultivan en un medio de cultivo concreto para identificar o aislar bacterias que son viables o que pueden crecer en presencia de una fuente de carbono seleccionada. Más en concreto, las bacterias se mantienen en el medio durante la etapa b) y/o c) y/o durante una etapa adicional e), para identificar o aislar las bacterias que son viables o que pueden cultivarse con la fuente de carbono deseada.
- 15 Debe entenderse que las anteriores características pueden seleccionarse de modo individual o en cualquier combinación. Por ejemplo, el método puede emplearse para identificar bacterias que son viables o que pueden cultivarse a una temperatura y una salinidad deseadas, o a una temperatura y un pH deseados, o a una temperatura, un pH y unas condiciones de oxigenación deseados.

- 20 Además, los métodos de esta invención pueden comprender otra etapa de modificar, por ejemplo, por medios biológicos, genéticos y/o químicos, las bacterias identificadas o aisladas, o su ADN, mediante cualquier proceso conocido *per se* en la técnica, y dicha modificación se dirige, por ejemplo, a mejorar la viabilidad, el crecimiento o las funciones de dicha bacteria, por ejemplo, la actividad enzimática. Esta etapa de modificación incluye, sin limitación, la fusión de células, la evolución acelerada, el reordenamiento del ADN, la mutagénesis, la inserción de un ácido nucleico eucariota, procariota o sintético (por ejemplo, ADN) procedente de otra cepa, o mediante la tecnología de la ingeniería genética. La modificación también puede incluir una etapa de introducir un gen marcador (por ejemplo, de resistencia a kanamicina) en la bacteria. Dicha etapa de modificación puede realizarse en las bacterias aisladas o en cualquier etapa previa del anterior proceso, por ejemplo, en la muestra de la etapa a).
- 25

La presente solicitud también describe una bacteria que puede obtenerse mediante el anterior método.

- 30 De modo más específico, un objeto de esta invención reside en una bacteria aislada, en la que dicha bacteria tiene la capacidad de crecer en presencia de lignina o celulosa o xilano como única fuente de carbono, a una temperatura de al menos 30 °C, y de resistir a un tratamiento con UV de 4 mJ/cm². La combinación de estas características no tiene precedentes y proporciona nuevos caminos al aprovechamiento de biomasa lignocelulósicas. En particular, la capacidad para resistir el anterior tratamiento con UV y de crecer a 30 °C o más permite el uso de las bacterias bajo condiciones industriales rigurosas especiales compatibles con la naturaleza de la biomasa. La capacidad de crecer en presencia de lignina, celulosa o xilano como única fuente de carbono (es decir, de emplear la lignina, la celulosa o el xilano como fuente de carbono) hace que las bacterias sean adecuadas para transformar cualquier tipo de biomasa lignocelulósica.
- 35

- 40 En otra realización preferida, la bacteria tiene la capacidad para emplear lignina, celulosa y xilano como fuente de carbono. En efecto, los inventores han identificado bacterias que son capaces de degradar todos los constituyentes principales de biomasa lignocelulósicas.

- 45 Además, tal como se ilustra en la sección experimental, los inventores han identificado bacterias que son capaces de crecer en condiciones aerobias o anaerobias o ambas. En un aspecto concreto y ventajoso, la solicitud describe bacterias, tal como se definió anteriormente, que pueden hacerse crecer o cultivarse en condiciones aerobias y anaerobias. En efecto, la solicitud demuestra, de modo inesperado, que las bacterias pueden operar en condiciones, tales como condiciones anaerobias, adecuadas para producir grandes cantidades de metabolitos o productos bioenergéticos a partir de diversos sustratos. Por tanto, la solicitud proporciona nuevos medios y composiciones para producir metabolitos o productos bioenergéticos a partir de una biomasa lignocelulósica y/o componentes de una biomasa lignocelulósica, concretamente celulosa, hemicelulosa y lignina, de una manera muy eficaz.

- 50 Las bacterias preferidas pueden hidrolizar una biomasa lignocelulósica para producir azúcares fermentables, y pueden cultivarse en condiciones aerobias o anaerobias.

Las bacterias descritas en la presente preferiblemente pertenecen a un género seleccionado de *Deinococcus*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Methylobacterium*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Caldimonas*, *Paenibacillus*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingobium*, *Sphingopyxis*, o *Porphyrobacter*.

- 55 Preferiblemente, las bacterias muestran las siguientes características:

- son viables o funcionales a altas temperaturas (por ejemplo, a aproximadamente 30-70 °C),

- son viables o funcionales en condiciones anaerobias,
- resisten a un tratamiento con UV de 4 mJ/cm², y
- son capaces de estimular la digestión de la celulosa para producir glucosa.

Otras bacterias preferidas muestran las siguientes características:

- 5
- son viables o funcionales a altas temperaturas (por ejemplo, a aproximadamente 30-70 °C),
 - son viables o funcionales en condiciones anaerobias,
 - resisten a un tratamiento con UV de 4 mJ/cm², y
 - son capaces de utilizar la lignina como fuente de carbono.

Otras bacterias preferidas muestran las siguientes características:

- 10
- son viables o funcionales a altas temperaturas (por ejemplo, a aproximadamente 30-70 °C),
 - son viables o funcionales en condiciones anaerobias,
 - resisten a un tratamiento con UV de 4 mJ/cm², y
 - son capaces de utilizar el xilano como fuente de carbono.

Otras bacterias preferidas muestran las siguientes características:

- 15
- son viables o funcionales a altas temperaturas (por ejemplo, a aproximadamente 30-70 °C),
 - son viables o funcionales en condiciones anaerobias,
 - resisten a un tratamiento con UV de 4 mJ/cm²,
 - son capaces de utilizar la lignina como fuente de carbono, y

- son capaces de estimular la digestión de la celulosa para producir glucosa, y/o

- 20
- son capaces de estimular la digestión del xilano para producir xilosa, y/o
 - son capaces de utilizar el xilano como fuente de carbono.

Las bacterias pueden mantenerse o cultivarse en un medio de cultivo adecuado tal como, sin limitación PGY (bacto-peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, glucosa 1 g/l) o LB (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, cloruro de sodio 10 g/l). Debe entenderse que los expertos en la técnica conocen otros medios de cultivo adecuados (Buchanan *et al.*, 1974, Difco, 1995) o estos pueden ser preparados por los expertos en la técnica a partir de dichos medios conocidos.

- 25
- En la sección experimental se proporcionan ejemplos ilustrativos específicos de bacterias descritas en la presente, junto con sus propiedades y técnicas de aislamiento. Debe entenderse que pueden aislarse o caracterizarse otras bacterias siguiendo las indicaciones de la presente invención.

- 30
- La presente solicitud también describe el uso de bacterias según proporcionan los inventores, o sus extractos, para producir productos valiosos a partir de una biomasa lignocelulósica.

A este respecto, la solicitud describe el uso de dicha bacteria, o un extracto de esta, para hidrolizar una biomasa lignocelulósica.

- 35
- La solicitud también describe el uso de dicha bacteria, o un extracto de esta, para transformar una biomasa lignocelulósica para producir metabolitos o productos bioenergéticos.

La solicitud también describe un método para degradar una biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables, comprendiendo dicho método exponer dicha biomasa lignocelulósica a una bacteria descrita en la presente, o a un extracto de esta.

- 40
- El método resulta particularmente adecuado para producir azúcares fermentables seleccionados de glucosa, celobiosa, manosa, xilosa, arabinosa o galactosa.

La presente solicitud también describe un reactor o un fermentador que comprende una biomasa lignocelulósica y una bacteria de la invención, o un extracto de esta.

La presente solicitud también describe un método para producir metabolitos o productos bioenergéticos, en particular etanol, comprendiendo dicho método exponer una biomasa lignocelulósica a una bacteria descrita en la presente, o a un extracto de esta. El método preferiblemente comprende además una etapa de recolectar dichos metabolitos o productos bioenergéticos.

5 La presente solicitud también describe un metabolito o un producto bioenergético que puede obtenerse mediante los anteriores métodos.

El cultivo o la exposición pueden realizarse en cualquier condición o entorno adecuado que permita la modificación de la biomasa lignocelulósica para producir metabolitos o productos bioenergéticos. A este respecto, el método puede realizarse en un reactor, en un fermentador, en un espacio abierto, en presencia de nutrientes o aditivos adecuados si es necesario. El método generalmente se realiza bajo unas condiciones de pH, a una temperatura mayor que 40 °C, y en presencia de sustratos adecuados.

En los anteriores métodos, la etapa de cultivar y/o hacer crecer la bacteria y la etapa de transformar la biomasa en metabolitos o productos bioenergéticos pueden llevarse a cabo de modo simultáneo o secuencial; y la etapa de recolectar los metabolitos o productos bioenergéticos puede llevarse a cabo de modo simultáneo con la primera y/o la segunda etapa, o de forma secuencial. A este respecto, la biomasa puede ponerse en contacto con la bacteria bajo condiciones adecuadas para permitir la expansión de dicha bacteria, aumentando con ello la eficacia del proceso. Como alternativa, las cepas bacterianas pueden expandirse por separado, bajo condiciones de cultivo adecuadas, y después añadirse a la biomasa. Debe entenderse que las cantidades precisas de bacterias empleadas inicialmente para transformar con eficacia una biomasa en importantes metabolitos o productos bioenergéticos pueden ser ajustadas por los expertos en la técnica dependiendo del tipo de bacteria, del tipo de biomasa y de las condiciones de cultivo.

En un aspecto particular del método, las bacterias se hacen crecer por separado de la conversión de la biomasa.

En un aspecto particular, el método descrito en la presente se realiza en un reactor de conversión de biomasa. Un "reactor" significa un tanque de fermentación convencional o cualquier aparato o sistema para la conversión de biomasa especialmente diseñado para ejecutar el método y que, por tanto, consiste en particular de biorreactores, biofiltros, interruptores biológicos rotatorios y otros biorreactores para fases gaseosas y/o líquidas para el tratamiento de biomasa. El aparato que puede emplearse según el método descrito en la presente puede usarse de modo continuo o con cargas discontinuas.

En el reactor, para ejecutar el método descrito en la presente se emplea al menos una bacteria o un extracto bacteriano descritos en la presente, y dicho reactor se dispone y se suministra de modo que en su interior se establezcan y se mantengan unas condiciones fisicoquímicas de modo que dicha bacteria sea operativa para la aplicación considerada y de modo que, opcionalmente, en su interior sea posible el crecimiento bacteriano y preferiblemente se estimule.

En otro aspecto del método descrito en la presente, las bacterias se hacen crecer en un reactor, durante la conversión de la biomasa, y se establecen y se mantienen unas condiciones fisicoquímicas adecuadas para que sea posible este crecimiento bacteriano y preferiblemente se estimule.

En aspectos alternativos, la conversión de la biomasa se realiza en aerobiosis, anaerobiosis o en microaerobiosis.

En los ejemplos se describen otros aspectos y ventajas de la invención, siendo estos ejemplos ilustrativos y no limitan el alcance de la protección.

40 **Ejemplos**

Materiales and y métodos

Ensayos de selección y composición de los medios de cultivo

Medio 167 Thermus

Triptona	1	g
Extracto de levadura	1	g
Agar	28	g
Ácido nitrilotriacético	100	mg
CaSO ₄ × 2 H ₂ O	40	mg
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	200	mg

ES 2 660 672 T3

Fe citrato 0,01 M	0,5	ml
Disolución de oligoelementos (véase a continuación)	0,5	ml
Tampón fosfato (véase a continuación)	100	ml
H ₂ O	900	ml
Ajustar hasta pH 7,2 con NaOH, someter a autoclave a 121 °C durante 15 min, someter a autoclave el tampón fosfato por separado y añadir al medio		

Tampón fosfato

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

Composición del medio mínimo

- 5 - Tampón MOPS 1× (pH 7) que contiene: tampón MOPS ácido 40 mM, NH₄Cl 20 mM, KOH 10 mM, NaOH 10 mM, CaCl₂ 0,5 μM, Na₂SO₄ 0,276 mM, MgCl₂ 0,528 mM.
- 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 4,0 (1 μg/l cada una): D-biotina, niacina, piridoxal-HCl, tiamina-HCl, vitamina B12.
- 10 - Fuente de fosfato: K₂HPO₄ 5,7 mM.
- FeCl₃ 20 μM (preparado en una disolución de citrato de sodio y después filtrado).

Detección de la actividad celulasa en la bacteria:

Principio:

- 15 El ensayo se basa en el seguimiento de la conversión de NAD en NADH durante la degradación de la celulosa. Después se controla el aumento en la absorbancia a 340 nm siguiendo las instrucciones del suministrador,

Detección de la producción de etanol:

El etanol puede cuantificarse empleando dos métodos.

Método enzimático:

- 20
$$\text{Etanol} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{ADH}} \text{Acetaldehído} + \text{NADH}$$

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

Esta reacción se traduce como un aumento en la absorbancia a 340 nm. Para esta medición puede emplearse el kit Sigma N7160 siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 25 Medición mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa

Condiciones:

- HPLC Gilson con inyector automático, detección mediante refractometría
- Columna: Phenomenex Rezex ROA, 300 mm × 7,8 mm
- Temperatura de la columna: 65 °C

- Fase móvil: ácido sulfúrico 0,005 N

- Caudal: 0,600 ml/min

5 En primer lugar se construye una curva de calibración inyectando un medio de cultivo que contiene concentraciones conocidas de etanol en la columna. Se mide el área del pico que eluye a 22,26 min, que corresponde al etanol. Se representa gráficamente una curva de calibración.

Después se mide la cantidad de etanol producido por la bacteria inyectando el sobrenadante del cultivo en la columna. Se mide el área del pico que eluye a 22,26 min, que corresponde al etanol. Se deduce la concentración de etanol presente en el sobrenadante mediante comparación con la curva de calibración.

10 La detección y la cuantificación de los otros metabolitos probablemente producidos en diversas proporciones puede realizarse empleando métodos convencionales de análisis y evaluación.

Ejemplo 1: Selección de bacterias termófilas resistentes a UV que emplean la celulosa como fuente de carbono y que crecen en anaerobiosis (figura 1)

15 Bacterias termófilas seleccionadas por su resistencia a rayos UV y aisladas a partir de muestras ambientales (3 tratamientos de 4 mJ/cm² con un intervalo de 4 horas) se inoculan sobre un medio de cultivo mínimo sólido esterilizado mediante autoclave (15 minutos a 120 °C) que contiene la fuente de carbono de interés al 1%: carboximetilcelulosa (CMC; Fluka, Francia) o xilano de madera de abedul (Fluka, Francia). El medio de cultivo mínimo está formado por una disolución de tampón MOPS a pH 7 y filtrada: tampón MOPS ácido 40 mM (Sigma, Francia), 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 a 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 a pH 4 (1 μg/l de D-biotina, niacina, piridoxal-HCl, tiamina-HCl y vitamina B12), una disolución de K₂HPO₄ a 5,7 mM, así como una disolución de FeCl₃ a 20 μM en NaH₂(C₃H₅O(COO)₃).

25 Se aseguran las condiciones de anaerobiosis mediante la adición de un GENbag Anaer (BioMérieux, Francia). Después de una incubación en anaerobiosis a 45 °C durante 4 a 5 días, las colonias que emplean la fuente de carbono presente en el medio de cultivo son visibles (véase la figura 1).

La bacteria resistente a UV denominada M11-2F es capaz de crecer en anaerobiosis y a 45 °C empleando CMC como única fuente de carbono.

Por tanto, esta bacteria es capaz de transformar una biomasa lignocelulósica en productos valiosos bajo condiciones industriales.

30 **Ejemplo 2: Selección de bacterias termófilas resistentes a UV que emplean xilano en anaerobiosis (figura 2)**

35 Bacterias termófilas seleccionadas por su resistencia a rayos UV y aisladas a partir de muestras ambientales (3 tratamientos de 4 mJ/cm² con un intervalo de 4 horas) se inoculan sobre un medio de cultivo mínimo sólido esterilizado mediante autoclave (15 minutos a 120 °C) que contiene la fuente de carbono de interés al 1%: carboximetilcelulosa (CMC; Fluka, Francia) o xilano de madera de abedul (Fluka, Francia). El medio de cultivo mínimo está formado por una disolución de tampón MOPS a pH 7 y filtrada: tampón MOPS ácido 40 mM (Sigma, Francia), 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 a 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 a pH 4 (1 μg/l de D-biotina, niacina, piridoxal-HCl, tiamina-HCl y vitamina B12), una disolución de K₂HPO₄ a 5,7 mM, así como una disolución de FeCl₃ a 20 μM en NaH₂(C₃H₅O(COO)₃).

40 Se aseguran las condiciones de anaerobiosis mediante la adición de un GENbag Anaer (BioMérieux, Francia). Después de una incubación en anaerobiosis a 45 °C durante 4 a 5 días, las colonias que emplean la fuente de carbono presente en el medio de cultivo son visibles (véase la figura 2).

45 La bacteria resistente a UV denominada M11-3C es capaz de crecer en anaerobiosis y a 45 °C empleando xilano procedente de madera de abedul como única fuente de carbono.

La bacteria resistente a UV denominada M11-9D es capaz de crecer en anaerobiosis y a 45 °C en un medio de cultivo que contiene CMC o xilano como fuente de carbono.

Por tanto, estas bacterias son capaces de transformar una biomasa lignocelulósica en productos valiosos bajo condiciones industriales.

50 **Ejemplo 3: Selección de bacterias resistentes a UV que son capaces de emplear lignina como fuente de carbono (figura 3)**

5 Bacterias seleccionadas por su resistencia a rayos UV a partir de muestras ambientales (3 tratamientos de 4 mJ/cm² con un intervalo de 4 horas) se inoculan sobre un medio de cultivo mínimo sólido que contiene lignina al 0,1% (Sigma, Francia). La composición del medio de cultivo mínimo se describió en los ejemplos previos. Después de una incubación a 30 °C durante 4 a 5 días, las colonias que emplean la lignina en el medio de cultivo como fuente de carbono son visibles (las bacterias que degradan la lignina decoloran el medio). Los resultados se muestran en la figura 3 y en las siguientes tablas 1 y 2.

Tabla 1

Entorno del biotopo	Nombre de la cepa	Temp. de aislamiento, °C	Medio de aislamiento	Vecinos más cercanos cultivados	aerobiosis	anaerobiosis
					Lignina	CMC + xilano
barro	M5-6H	30 °C	PGY	<i>Bacillus</i>	+	+
deposiciones animales	M6-2H	30 °C	PGY	<i>Microbacterium</i>	+	+
pedras	M6-4H	30 °C	PGY	<i>Cellulosimicrobium</i>	+	+
	M8-1B	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-1H	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-2B	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-3A	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-3C	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-4A	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-4B	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-4H	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-5A	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-5B	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-6G	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	M8-7E	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
	musgo	M8-9E	30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+
M8-9H		30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
M8-11C		30 °C	PGY	<i>Methylobacterium</i>	+	+
deposiciones animales	M9-2E	30 °C	PGY	<i>Sphingobacterium</i>	+	+
	M9-3E	30 °C	PGY	<i>Sphingobacterium</i>	+	+
	M9-3F	30 °C	PGY	<i>Sphingobacterium</i>	+	+
deposiciones de vaca	M9-7D	30 °C	PGY	<i>Pseudomonas</i>	+	+
	M9-7E	30 °C	PGY	Bacteria no cultivada aislada de heces de oveja Argalis	+	+

Tabla 2

Biotopo	Nombre	Temp. de aislamiento, °C	Medio de aislamiento	Vecinos más cercanos cultivados	Fuente de carbono					
					aerobiosis			anaerobiosis		
					CMC	Xilano	Lignina	CMC	Xilano	Lignina
Agua	MX1-1B	45 °C	MM + xilano al 1%	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	+
Agua	MX1-6G	45 °C	MM + xilano al 1%	<i>Caldimonas</i>	+	+	+		+	-
Agua	MX1-7B	45 °C	MM + xilano al 1%	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	+	+	+
Agua	MX1-7C	45 °C	MM + xilano al 1%	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	+	+	+
Agua	MC1-1D	45 °C	MM + CMC al 1%	<i>Gordonia</i>	+	+	+	+	+	-
Agua	MC1-1G	45 °C	MM + CMC al 1%	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	-	-	-
Agua	MC1-2A	45 °C	MM + CMC al 1%	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	+	-
Sedimento	MC1-2D	45 °C	MM + CMC al 1%	<i>Paenibacillus</i>	+	+	+	-	+	-
Agua	M10-1D	30 °C	PGY	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	nd	nd	nd
	M10-1E	30 °C	PGY	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	nd	nd	nd
	M10-8D	30 °C	PGY	<i>Stenotrophomonas</i>	+	+	+	nd	nd	nd

5 Por tanto, estas bacterias son capaces de transformar una biomasa lignocelulósica en productos valiosos bajo condiciones industriales. El empleo de la lignina como fuente de carbono por las bacterias que pertenecen a los géneros *Sphingobacterium*, *Microbacterium* o *Cellulosimicrobium* nunca ha sido descrito hasta ahora.

Ejemplo 4: Conversión de una biomasa lignocelulósica

10 Una muestra de bacterias procedente de un cultivo líquido realizado en medio rico se lava con agua desionizada antes de inocular (1/10) 20 ml de medio mínimo que contiene tampón MOPS ácido 40 mM (Sigma, Francia), 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 a 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 a pH 4 (1 µg/l de D-biotina, niacina, piridoxal-HCl, tiamina-HCl y vitamina B12), una disolución de K₂HPO₄ a 5,7 mM, así como una disolución de FeCl₃ a 20 µM en NaH₂(C₃H₅O(COO)₃).

15 Se emplea papel de periódico y/o papel Whatman como fuente de biomasa lignocelulósica y fuente de carbono. Se añaden aproximadamente 140 mg de papel de periódico al medio de cultivo descrito anteriormente. La degradación del papel de periódico y/o del papel Whatman se controla durante varias semanas y se compara con el tubo control (sin bacterias en el medio de cultivo).

Los resultados se muestran en la figura 4. La cepa DRH46 de *Deinococcus* es capaz de degradar el papel de periódico y/o papel Whatman. La degradación se visualiza con la liberación de fibras de papel al medio de cultivo, que se enturbia después de varias semanas de crecimiento (comparar con el tubo control).

20 Ejemplo 5: Selección de *Deinococci* xilanolíticas y celulolíticas resistentes a UV que producen un nivel detectable de etanol

Bacterias seleccionadas por su resistencia a rayos UV a partir de muestras ambientales (3 tratamientos de 4 mJ/cm² con un intervalo de 4 horas) se inoculan a 45 °C sobre un medio de cultivo mínimo sólido que contiene papel de filtro Whatman I o xilano como única fuente de carbono del sustrato lignocelulósico. La composición del medio de cultivo

- 5 mínimo se describió en los ejemplos previos. El papel Whatman I se degrada después de varias semanas de incubación con bacterias a 45 °C, mientras que no se observa degradación del papel de filtro Whatman I tratado de la misma manera en que se describió anteriormente pero que no contiene bacterias (control). Además, se observó un aumento en la opacidad del medio de cultivo que contiene las bacterias cultivadas en xilano como única fuente de carbono después de varios días de incubación a 45 °C comparado con el medio control que no contiene bacterias, lo cual indica un crecimiento bacteriano en dichas condiciones. Entonces se determinan las propiedades metabólicas de las cepas para evaluar su capacidad para producir etanol. Entre las diversas cepas identificadas, pueden mencionarse las siguientes, que son celulolíticas, xilanolíticas y producen etanol.

Especie	Nombre de la cepa	Almidón	Sacarosa	Xilano	Papel Whatman I	Glucosa	Producción de EtOH (%)
<i>D. murrayi</i>	M13-8D	+	+	+	+	+	0,016

- 10 Este ejemplo ilustra además la eficacia del método de la presente invención y la capacidad para aislar bacterias que tiene las propiedades notables seleccionadas cuando se aplica el método reivindicado a diversas muestras.

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar o identificar una bacteria, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
 - a) proporcionar una muestra que comprende bacterias no caracterizadas;
 - 5 b) someter la muestra a un tratamiento de irradiación repetido que reduce en al menos 2 log la titulación bacteriana en un cultivo de *E. coli*, llevándose a cabo las irradiaciones en un intervalo de entre 1 y 8 horas; y
 - c) aislar, a partir de dicha muestra tratada, una bacteria que tiene la capacidad de emplear la lignina, la celulosa y/o el xilano como fuente de carbono.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es o se deriva de una muestra ambiental, preferiblemente obtenida o derivada de tierra, agua, fuentes termales, entornos marinos, barro, madera, piedra, musgo, extractos vegetales, líquen, material biológico, sedimentos, tierra turbosa, biopelículas, efluentes industriales, gases, arena, petróleo, aguas residuales o deposiciones animales o humanas.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho tratamiento comprende varias irradiaciones seleccionadas de una o más irradiaciones con rayos UV, rayos gamma y/o rayos X, solas en combinaciones, lo más preferiblemente a una o más irradiaciones UV.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el tratamiento comprende someter la muestra al menos a 2, preferiblemente al menos a 3 tratamientos con UV de entre 0,5 y 400 mJ/cm², más preferiblemente de entre 1 y 200 mJ/cm², y generalmente de entre 1 y 100 mJ/cm² cada uno, realizados en un intervalo de entre 1 y 8 horas.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa b) se realiza en un medio de cultivo sólido.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las etapas b) y c) se realizan de modo secuencial, en cualquier orden, o de modo simultáneo.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una etapa de modificar, por medios biológicos, genéticos y/o químicos, las bacterias identificadas o aisladas, o su ADN, para mejorar la viabilidad, el crecimiento o las funciones de dicha bacteria.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa c) comprende la selección de una bacteria que crece en presencia de lignina como única fuente de carbono.



Figura: Resultados de crecimiento de aislados termófilos resistentes a UV en MM + CMC al 1% en condiciones de anaerobiosis. Los aislados que aparecen en los ejemplos 1 y 2 están perfilados en rojo.

Figura 1

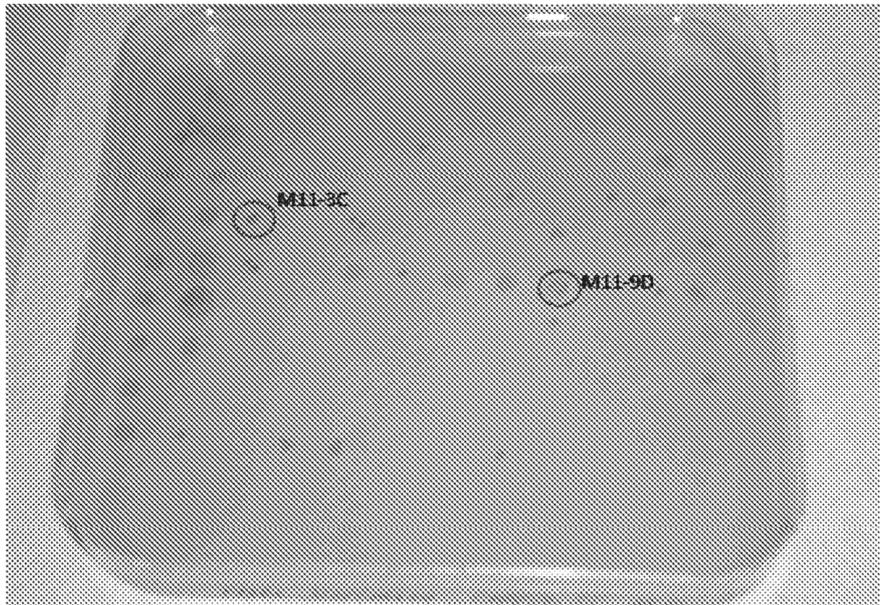


Figura: Resultados de crecimiento de aislados termófilos resistentes a UV en MM + xilano al 1% en condiciones de anaerobiosis. Los aislados que aparecen en el ejemplo 2 están perfilados en rojo.

Figura 2

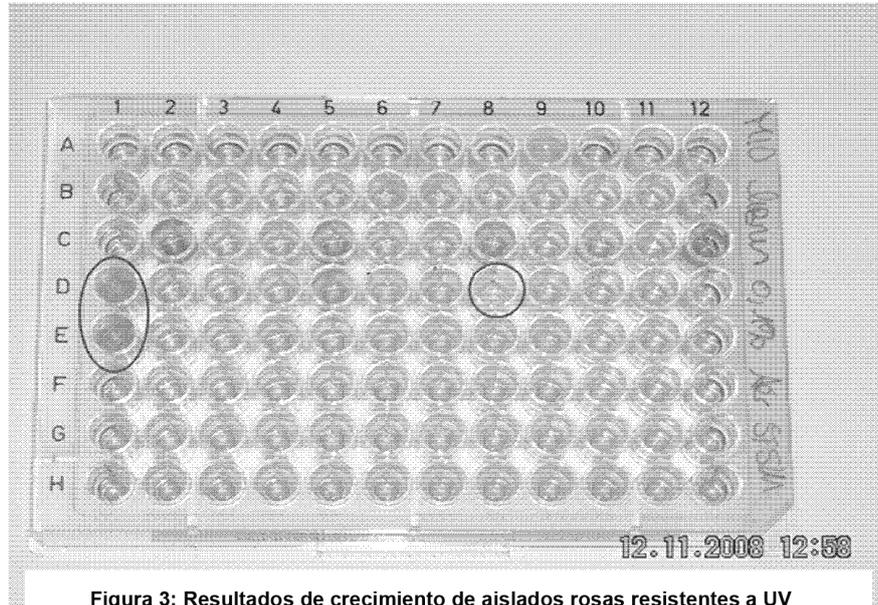


Figura 3: Resultados de crecimiento de aislados rosas resistentes a UV en MM + lignina al 1% en condiciones de anaerobiosis a 30 °C después de 5 días. Perfilados en rojo, los aislados M10-1D y M10-1E son capaces de emplear la lignina como única fuente de carbono, y M10-8D es capaz de degradar la lignina.

Figura 3

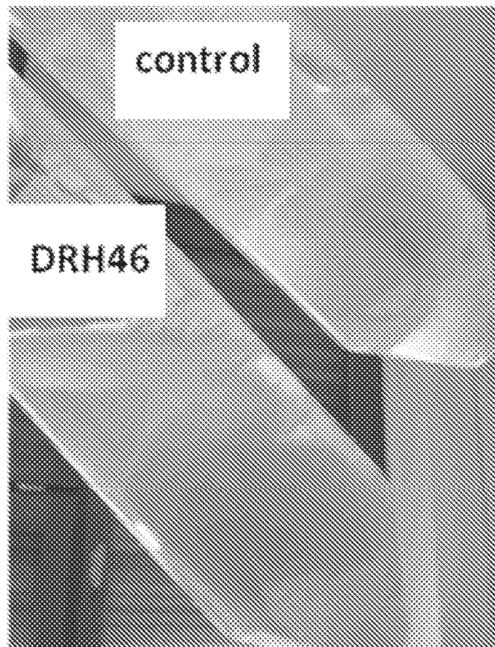


Figura 4