



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.06

(21) Номер заявки
201201206

(22) Дата подачи заявки
2011.03.02

(51) Int. Cl. **C12N 1/20** (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИИ DEINOCOCCUS И ЕЕ ЭКСТРАКТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И БЕЛКОВ, А ТАКЖЕ ДЛЯ РАЗЛОЖЕНИЯ БИОМАССЫ

(31) 10305212.2; 61/309,931

(32) 2010.03.02; 2010.03.03

(33) EP; US

(43) 2013.04.30

(86) PCT/EP2011/053089

(87) WO 2011/107506 2011.09.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЕИНОВ; ЮНИВЕРСИТЕ ДЕ
МОНПЕЛЬЕ; САНТР НАСЬОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ СЪЕНТИФИК
(С.Н.Р.С.) (FR)**

(72) Изобретатель:
**Клавери Жан-Мишель, Битон Жак,
Леонетти Жан-Поль (FR)**

(74) Представитель:
Воробьева Е.В., Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2009063079

EP-A1-2218773

WEON HANG-YEON ET AL.: "Deinococcus cellulossilyticus sp. nov., isolated from air", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB LNKD-DOI:10.1099/IJS.0.64951-0, vol. 57, no. Part 8, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 1685-1688, XP002534882, ISSN: 1466-5026, the whole document

MAKAROVA KIRA S. ET AL.: "Genome of the extremely radiation-resistant bacterium Deinococcus radiodurans viewed from the perspective of comparative genomics", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD-DOI:10.1128/MMBR.65.1.44-79.2001, vol. 65, no. 1, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 44-79, XP002491113, ISSN: 1092-2172, the whole document, page 67, column 2, paragraph 2

OMELCHENKO MARINA V. ET AL.: "Comparative genomics of Thermus thermophilus and Deinococcus radiodurans: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance", BMC

EVOLUTIONARY BIOLOGY, vol. 5, October 2005 (2005-10), XP002604520, ISSN: 1471-2148, the whole document

RAINEY FRED A. ET AL.: "Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus Deinococcus obtained from a single soil sample", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD- DOI:10.1128/AEM.71.9.5225-5235.2005, vol. 71, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 5225-5235, XP009116344, ISSN: 0099-2240, the whole document

WEISBURG W.G. ET AL.: "THE DEINOCOCCUS AND THERMUS PHYLYUM AND THE EFFECT OF RIBOSOMAL RNA COMPOSITION ON PHYLOGENETIC TREE CONSTRUCTION", SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, URBAN UND FISCHER VERLAG, DE, vol. 11, no. 2, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 128-134, XP009139803, ISSN: 0723-2020, the whole document, figure 1

-& DATABASE EMBL [Online], 23 November 1989 (1989-11-23), "D.radiodurans 16S ribosomal RNA gene.", XP002633260, retrieved from EBI accession no. EM_PRO:M21413, Database accession no. M21413, compound

SUIHKO ET AL.: "Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments", SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, URBAN UND FISCHER VERLAG, DE, vol. 30, no. 6, 31 July 2007 (2007-07-31), pages 494-508, XP022182004, ISSN: 0723-2020, DOI: DOI:10.1016/J.SYAPM.2007.05.001, the whole document

-& DATABASE EMBL [Online], 7 August 2007 (2007-08-07), "Deinococcus sp. VTT E-052909 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.", XP002633261, retrieved from EBI accession no. EM_PRO:EF093134, Database accession no. EF093134, compound

DATABASE EMBL [Online], 26 June 2006 (2006-06-26), "Deinococcus sp. Han23 partial 16S rRNA gene, strain Han23", XP002633262, retrieved from EBI accession no. EM_PRO:AM283039, Database accession no. AM283039, compound

RAINEY FREDERICK A. ET AL.: "Phylogenetic diversity of the deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 47, no. 2, 1997, pages 510-514, XP002604521, ISSN: 0020-7713, the whole document

-
- (57) Настоящее изобретение относится к применению бактерии *Deinococcus* и ее экстракта в фармацевтической или агрохимической промышленности. Указанная бактерия *Deinococcus* характеризуется тем, что имеет размер генома более 3,9 мегабаз и содержит 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований. Данная бактерия и ее экстракт могут применяться для разложения биомассы или производства метаболитов и лекарственных средств, представляющих промышленный интерес. В частности, они могут использоваться для получения органических кислот, спиртов, рекомбинантных белков, ферментов, антибиотиков, бактериостатических соединений или противогрибковых агентов. Кроме того, предлагается способ получения указанной бактерии *Deinococcus*.

Настоящее изобретение относится к применению новой бактерии *Deinococcus* в фармакологической или агрохимической промышленности, например, для разложения биомассы и/или производства метаболитов или лекарственных средств, представляющих промышленный интерес.

Уровень техники

Превращение лигноцеллюлозной биомассы являлось предметом интенсивных исследований с 1970 годов (Blumer-Schuette et al., 2008, *Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects*, *Curr Opin Biotechnol* 19, p. 210-217; Perez et al., 2002, *Int Microbiol* 5, p. 53-63). Однако считается, что будущее биотопливо и биоэнергетические продукты должны образовываться из сырой лигноцеллюлозной биомассы вместо сельскохозяйственного сырья.

WO 2009/063079 описывает использование стрессоустойчивых бактерий, таких как бактерии *Deinococcus*, для производства биоэнергетических продуктов и метаболитов путем разложения и ферментации биомассы. WO 2010081899, не опубликованная на дату приоритета настоящей заявки, описывает способность таких бактерий, как *Deinococcus*, производить ценные лекарственные препараты, включая антибиотики.

Направляя свои исследования на идентификацию бактерий с улучшенными свойствами, авторы изобретения идентифицировали и выделили определенный штамм бактерий *Deinococcus*, названный M1-3H. Изобретатели выделили и выбрали эту бактерию, основываясь на ее замечательной способности разлагать компоненты биомассы и производить метаболиты. Более детально анализируя эту бактерию, авторы неожиданно обнаружили, что ее геном очень велик, т.е. длиной свыше 4 мегабаз (Мб), по сравнению с величиной длины генома классической бактерии *Deinococcus*. Действительно, средняя величина генома бактерии *Deinococcus* равна приблизительно 3,0 Мб. Кроме того, авторы с удивлением обнаружили, что геном этой бактерии отличается определенной степенью геномного разнообразия, т.е. существенное количество генетического материала, было приобретено путем генетического переноса от различных других видов.

Некоторые бактерии рода *Deinococcus* были секвенированы: *Deinococcus radiodurans* (White O. et al., *Science* 1999 Nov 19; 286(5444): 1571-7), *Deinococcus geothermalis* (Makarova K.S. et al. *PLoS One*. 2007 Sep 26; 2(9):e955) и *Deinococcus deserti* (De Groot A. et al., *PLoS Genet*. 2009 Mar; 5(3): e1000434). Ни одна из этих бактерий не обладала свойствами M1-3H.

Таким образом, настоящее изобретение впервые описывает существование бактерий, относящихся к *Deinococcus* и обладающих неожиданными свойствами (1) имеющих геном, значительно больший, чем известные виды *Deinococcus*, и (2) имеющих приобретенное генетическое разнообразие, от различных других видов. Настоящее изобретение впервые описывает также существование относящихся к *Deinococcus* бактерий, имеющих неожиданные свойства (1) имеющих геном, значительно меньший, чем известные виды *Deinococcus*, и (2) имеющих приобретенное генетическое разнообразие от различных других видов. Эти бактерии, а также их применение представляют предмет рассмотрения настоящего изобретения.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к применению новой бактерии, а также ее экстракта, в фармацевтической и агрохимической промышленности, например, для превращения лигноцеллюлозной биомассы или ее производных в ценные продукты, включая ферментируемые сахара и биоэнергетические продукты для производства лекарственных препаратов или дезинтоксикантов.

Объектом настоящего изобретения является применение бактерии *Deinococcus*, имеющей размер генома более 3,9 мегабаз и содержащей 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, для получения органической кислоты, спирта, рекомбинантного белка, фермента, антибиотика, бактериостатического соединения или противогрибкового агента. Далее изобретение относится к применению указанной бактерии для разложения биомассы.

Особые дополнительные характеристики бактерий по данному изобретению включают любую одну, несколько или все из следующих характеристик:

- бактерия устойчива к действию ультрафиолета в дозе 4 мДж/см²;
- бактериальный геном характеризуется геномным разнообразием, являющимся результатом переноса генов, превышающим 15%, предпочтительно более 25%, более предпочтительно более 50%;
- бактерия дополнительно содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты;
- бактерия устойчива к стрессу;
- бактерия мезофильна или термофильна;
- бактерия жизнеспособна между pH 4 и 9;
- бактерия жизнеспособна в присутствии 2% этанола;
- бактерия может быть выращена в условиях аэробно-анаэробного роста и/или
- бактерия может использовать лигнин, целлюлозу, гемицеллюлозу, крахмал, ксилан, полисахарид, ксилозу, сахарозу или глюкозу или их производные в качестве источника углерода.

Изобретение относится также к применению экстракта данной бактерии для получения органической кислоты, спирта, рекомбинантного белка, фермента, антибиотика, бактериостатического соедине-

ния или противогрибкового агента. Указанный экстракт выбран из клеточного супернатанта, экстракта клеточных обломков, экстракта клеточных стенок и экстракта, содержащего ДНК, и получен путем химической, физической и/или ферментативной обработки бактериальных клеток.

Еще одним объектом изобретения является применение данного экстракта в целях разложения биомассы.

Изобретение относится к способу производства метаболита, причем этот способ включает выбор бактерий по данному изобретению, производящих упомянутый метаболит, культивирование этих бактерий и выделение метаболита из культуральной среды. Данный метаболит представляет собой органическую кислоту или спирт.

В другом специальном воплощении изобретение относится к способу производства лекарственных средств, включающий отбор определенных выше бактерий, производящих упомянутые лекарственные средства, культивирование этих бактерий и выделение упомянутого лекарственного средства из культуральной среды.

Изобретение относится также к способу получения бактерий по данному изобретению, включающему:

- a) обеспечение образца, содержащего бактерии *Deinococcus*;
- b) определение величины генома бактерий в упомянутом образце и
- c) отбор из упомянутого образца тех бактерий *Deinococcus*, у которых величина генома больше 3,9 мегабаз.

Подписи к фигурам

Фигура: PCR, выполненная с праймерами DeinoF1 и DeinoR3. Дорожки 4, 5, 10, 11, 14 и 15 - это штаммы *Deinococcus*, дорожки 1-3, 6-9, 12 и 13 не являются штаммами *Deinococcus*.

Детальное описание изобретения

Изобретение описывает выделение и характеристику новых бактерий, обладающих замечательной способностью разлагать биомассу и/или продуцировать биоэнергетические продукты, лекарственные препараты или ценные метаболиты.

Определения

Величина генома.

Величина генома - это полное количество ДНК, содержащееся в одной копии генома. Обычно его измеряют как полное число пар нуклеотидных оснований, обычно в мегабаз (миллионы пар оснований обозначают аббревиатурой Мб или Мбп). Способы измерения величины генома сами по себе хорошо известны специалистам. Они включают без ограничений технологии секвенирования последовательности (например, www.illumina.com/Documents/.../technote_denovo_assembly_ecoli.pdf), полную геномную гибридизацию и калькуляцию Cot1/2 (Chakrabarti S.K. et al. Cellular и Molecular life science, 1984 40: 1290-1291), или электрофорез в пульсирующем поле (Chen H. et al. JounPHKl of bacteriology 1990, 190: 4206-4213).

Геномное разнообразие.

Геномное разнообразие означает количество генетического материала, которое получает организм от другого организма, не будучи потомком этого организма. Геномное разнообразие может возникнуть в результате включения в процессе эволюции генетического материала путем геномного переноса, такого как Горизонтальный геномный перенос (ГПГ), называемый также Латеральным геномным переносом (ЛПГ). ГПГ или геномное разнообразие происходит или наблюдается, когда геномная или белковая последовательность определенного организма имеет большее сходство с гомологом очень отдаленного организма, чем с заведомо более близкими родственными организмами. Перенос генетического материала от одного штамма бактерий к другому может осуществляться с помощью нескольких процессов, включая трансформацию, конъюгацию и/или трансдукцию.

Трансформация означает поглощение депротеинизированной ДНК. Это обычное явление, и оно может опосредовать обмен любой части хромосомы; этот процесс происходит, главным образом, в бактериях, которые трансформируемы естественным путем.

Конъюгация - это перенос ДНК, опосредованный конъюгационными плазмидами или транспозонами. Он требует межклеточных контактов, но может происходить и между отдаленно родственными бактериями или даже между бактериями и эукариотическими клетками.

Трансдукция относится к переносу ДНК фагом. Она требует, чтобы на клеточной поверхности донора и реципиента были рецепторы связывания фага и поэтому обычно ограничена близко родственными бактериями; при этом длина переносимой ДНК ограничена размером головки фаговой частицы.

Величину геномного разнообразия измеряют в процентах генетического материала в геноме, который может быть приобретен путем генетического переноса от других организмов. Техники прогноза для определения процента доли геномного разнообразия или процентов ГПГенов (горизонтально перенесенных генов) включают без ограничений (i) определение кодона, (ii) BLAST, (iii) распределение генов и (iv) филогенез (Whitake J.W. et al., Biochemical Society Transactions 2009, 37: 792-795).

Выделенные.

По отношению к бактерии термин "выделенная" показывает, что бактерия была или является куль-

тивированной, обогащенной, выращенной, амплифицированной, отобранной и/или охарактеризованной или произошедшей от бактерий, которые были культивированы, обогащены, выращены, амплифицированы, отобраны и/или охарактеризованы. Выделенные бактерии или их потомство могут быть помещены в разные условия или в разные культуральные среды, смешенные с различными субстратами.

Метаболит.

Термин "метаболит" обозначает все возможные промежуточные молекулы, генерируемые в процессе ферментации, включая химические продукты, имеющие промышленное значение, такие как органические кислоты, спирты и строительные блоки, но не ограничиваясь ими.

Характерные примеры органических кислот включают, более предпочтительно формат, ацетат, лактат, бутират, глюконат, ксилат, цитрат, сукцинат, пропионат, фумарат, малат, пируват, итакониевую кислоту и койевую кислоту.

Характерные примеры спиртов включают, более предпочтительно этанол, бутанол, пропанол, метанол, изопропанол, пропандиол, глицерин или 2-3 бутан диол, предпочтительно этанол.

Метаболитами, которые могут найти также применение в косметике или сельском хозяйстве, например, являются пигменты, инсектициды пестициды, соединения вызывающие деградацию химических веществ и т.д.

Лекарственный препарат.

Термином лекарственный препарат обозначают обычно любое соединение, обладающее биологической активностью. Этот термин включает любой белок, полипептид, пептид, химические лекарства, липиды, сахараиды и т.д., обладающие биологической активностью, которые могут быть использованы в медицинской или ветеринарной фармацевтической промышленности. Примеры таких лекарственных препаратов включают без ограничений антибиотики, гормоны, бактериостатические соединения, анти-метаболиты, химиотерапевтические соединения, противогрибковые агенты, противовирусные соединения, соединения с цитокиновой активностью, факторы роста клеток, вакцины и адъюванты.

Биомасса.

В контексте данного изобретения термин "биомасса" относится к живому или недавно погибшему биологическому материалу, который может использоваться как топливо или для промышленного производства. Чаще всего термин биомасса относят к растительному материалу, выращенному для генерации электроэнергии или производства биотоплива, но он включает также растительное или животное сырье, применяемое для производства волокон, химических препаратов или тепла. Биомасса может также включать биodeградируемые отходы, которые можно сжигать в качестве топлива. Термин биомасса не включает органические материалы, которые в результате геологических процессов превращаются в уголь и нефть.

Промышленная биомасса может быть выращена из многих типов растений, включая мискант, просо, коноплю, сахарную свеклу, пшеницу, кукурузу, тополь, иву, сорго, сахарный тростник, и множеству видов деревьев, от эвкалиптов до масличной пальмы.

Биомасса по данному изобретению содержит сырую биомассу и/или вторичную биомассу. Сырая биомасса - это не обработанный материал из биологического сырья. Примеры включают лесные продукты, такие как взрослые деревья, не пригодные для производства пиломатериалов или бумаги, продукты сельского хозяйства, такие как травы, сельскохозяйственные продукты, навоз животных и водные продукты, такие как водоросли и морские водоросли. Вторичная биомасса - это любой материал, исходно полученный из сырой биомассы, подверженной значительным химическим и физическим изменениям. Примеры включают бумагу, выделанную кожу, хлопковые ткани, пеньку, натуральные резиновые изделия, побочные продукты при переработке пищи и отработанные пищевые масла.

Термин "лигноцеллюлозная биомасса" по настоящему изобретению обозначает сырую биомассу, содержащую лигнин, целлюлозу и/или ксилан. Термин "лигноцеллюлозная биомасса", таким образом, действительно относится к необработанному материалу биологического происхождения, такому как лесные продукты, включая взрослые деревья, не пригодные для производства пиломатериалов или бумаги, продуктов сельского хозяйства, таких как травы, сельскохозяйственные продукты, навоз животных и водные продукты, такие как водоросли и морские водоросли. Характерные источники биомассы включают без ограничений стволы с твердой и мягкой древесиной, кукурузные початки, пшеничную солому, траву, листья, семена, бумагу и т.д. (см., например, Sun et al., Bioresource Technology 83 (2002), 1-11). Термин "лигноцеллюлозная биомасса" следует отличать от термина "преобразованная биомасса", или "вторичная биомасса", которая обязательно содержит продукты предварительно обработанной гидролизованной биомассы.

Примеры лигноцеллюлозной биомассы включают древесный или овощной материал, полученный из многих типов растений, включая мискантус, просо, коноплю, сахарную свеклу, пшеницу, кукурузу, тополь, иву, сорго, сахарный тростник и множество видов деревьев от эвкалиптов до масличной пальмы.

В настоящем изобретении термин "производные биомассы" означает все молекулы, произошедшие из сырой биомассы и/или из вторичной биомассы, как было определено выше, и, в частности, подвергнутые существенным химическим и физическим изменениям, например, таким как крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин.

Устойчивость к стрессу.

В контексте данного изобретения термин "стрессоустойчивая бактерия" обозначает бактерию, обладающую способностью полностью или частично восстанавливать целостность своего генома, разрушенного стрессом. Стрессом может служить любое, разрушительное для клетки повреждающее ДНК воздействие, т.е. воздействие, достаточное, чтобы вызвать гибель 90% или больше клеток в культуре бактерий *E.coli*. Даже более предпочтительно разрушительным для клетки воздействием, повреждающим клеточную ДНК, является такое воздействие, которое достаточно, чтобы снизить бактериальный титр в культуре *E.coli* по меньшей мере в 2 log. Примеры такого воздействия включают облучение, предпочтительно повторяющееся облучение, такое как повторяющееся и чередующееся ультрафиолетовое облучение и/или использование генотоксических агентов. Предпочтительное "стрессовое" воздействие - это UV облучение между 0,5 и 400 мДж/см², более предпочтительно между 1 и 200 мДж/см², обычно между 1 и 100 Дж/см², в течение периода времени приблизительно от 5" до 5'. Предпочтительная UV обработка - 4 Дж/см² в течение 30 с, которая может быть повторена с интервалом между 1 и 8 ч, предпочтительно от 3 до 5 ч и более предпочтительно с интервалом приблизительно 4 ч.

В изобретении предлагается новая бактерия с неожиданными свойствами и преимуществами. Эти бактерии имеют удивительно большой геном и/или удивительно большую величину геномного разнообразия и демонстрируют свойства, полезные для производства соединений или проявляют активности, в области фармацевтической или агрохимической промышленности.

В частности, объектом данного изобретения является выделенная бактерия с величиной генома более 3,9 мегабаз, где упомянутая бактерия (i) содержит 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA (SEQ ID NO: 1) и GGTATCTACGCATTCACCGCTA (SEQ ID NO: 2) образует фрагмент величиной приблизительно 158 пар оснований и/или (ii) устойчива к облучению UV в дозе 4 мДж/см².

Даже более предпочтительно геном упомянутой бактерии имеет размер больше 4,0 мегабаз, больше 4,2 Мб, больше 4,5 Мб или даже больше 5 Мб. Открытие такой бактерии было совершенно неожиданным, имея в виду, что средний геном родственных штаммов, таких как штаммы *Deinococcus*, имеет объем приблизительно 3,0 Мб.

Кроме того, авторы изобретения обнаружили бактерии с необыкновенно высоким уровнем геномного разнообразия, т.е. генетического материала, приобретенного от других организмов. Более конкретно, бактерии по данному изобретению предпочтительно имеют геномное разнообразие более 15%, более предпочтительно 25, 30, 40 или даже более 50%. Это свойство является особенно замечательным, поскольку присутствие разнообразного генетического материала обеспечивает бактерию широким спектром свойств и активностей.

В частности, объектом данного изобретения является выделенная бактерия, содержащая 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCACCGCTA образует фрагмент величиной приблизительно 158 пар оснований, и геном упомянутой бактерии отличается геномным разнообразием, являющимся результатом генного переноса, превосходящим 15%, предпочтительно больше 25%, более предпочтительно превосходящим 50%.

Присутствие упомянутого выше фрагмента 158 ПО характерно для бактерий, относящихся к *Deinococcus*. Этот признак или способность противостоять особым упомянутым выше условиям облучения являются дополнительными свойствами бактерий по данному изобретению.

В дальнейшем воплощении бактерия может дополнительно включать молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, т.е. молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты вводят в упомянутую бактерию или в ее предка. Такая рекомбинантная нуклеиновая кислота обычно является искусственной, созданной для того, чтобы содержать определенный ген или кластер, и состоит из ДНК или РНК.

Даже более детально, бактерии, кроме упомянутых свойств, проявляют одно или больше или все из всех следующих свойств:

они мезофильны, т.е. могут жить, расти и проявлять функциональные свойства при температуре приблизительно между 30 и 35°C,

они жизнеспособны при pH между 4 и 9,

они жизнеспособны в присутствии 2% этанола,

они могут расти в аэробных и анаэробных условиях и/или

они могут использовать целлюлозу или ее производные в качестве источника углерода.

Кроме того, предпочтительная бактерия по данному изобретению может также использовать в качестве источника углерода другие субстраты, в частности глюкозу, крахмал и сахарозу. Предпочтительная бактерия по данному изобретению может использовать в качестве источника углерода также карбоксиметилцеллюлозу, целлюлозу, целлобиозу, гемицеллюлозу и ксилу.

Бактерии можно культивировать и/или поддерживать в любой подходящей культуральной среде и в любом устройстве. Примеры такой среды включают сложную глюкозную среду или определенную среду, описанную в примерах. Подходящие среды коммерчески доступны.

Типичные примеры бактерий по данному изобретению - это штаммы *Deinococcus* M1-3H и M23r-2A

или производное, мутант, трансформант или потомок упомянутых бактерий.

Как описано в примерах, эти штаммы способны расти при значениях pH между 5 и 9, и имеют очень большой геном. Кроме того, эти штаммы имеют значительное геномное разнообразие, измеряемое в процентах ГПГенов (генов, перенесенных путем горизонтального переноса), более 15 или 25%.

Следующий пример бактерий по данному изобретению - это штамм *Deinococcus* DRH048 или его производное, мутант, трансформант или потомок упомянутой бактерии.

Как описано в примерах, этот штамм может расти при значениях pH между 5 и 9 и имеет геном более 5,9 Мб. Кроме того, этот штамм имеет очень высокий уровень геномного разнообразия, при измерении в процентах ГПГенов, более 60%, и устойчив к рифампицину.

Эти мега-*Deinococcus* бактерии могут расти на всех проверенных сложных источниках углерода, включая инулин и волокнистую целлюлозу, которые являются простыми и сложными источниками углерода. Следует отметить, что ни одна из проверенных бактерий *Deinococcus*, имеющих обычный размер генома, не могла расти на этих источниках углерода. Ни одна из проверенных бактерий *Deinococcus*, имеющих обычный размер генома, не могла использовать инулин и волокнистую целлюлозу.

Проверенные мега-*Deinococcus* бактерии могли также использовать все проверенные источники азота, включая сложные источники азота, такие как NaNO_2 .

Следует отметить, что мега-*Deinococcus* бактерии не проявляют ауксотрофии к витаминам и способны расти на среде, лишенной биотина, ниацина, пиридоксина, тиамина и/или витамина B12. DRH048 может расти даже на среде, лишенной витаминов.

К своему удивлению и удовольствию авторы изобретения обнаружили, что мега-*Deinococcus* бактерии обладают повышенным количеством и разнообразием генов, принимающих участие в энергетическом метаболизме. По сравнению с бактериями *Deinococcus*, имеющими обычный размер генома, предпочтительные бактерии мега-*Deinococcus* проявляют по меньшей мере на 15%, более предпочтительно по меньшей мере на 25, 40% или даже по меньшей мере на 50% больше генов, участвующих в энергетическом метаболизме, т.е. генов, кодирующих белки, участвующие в биологических путях и реакциях, вносящих вклад в создание или накопление энергетических продуктов или метаболитов в клетке. Они включают без ограничений пути и реакции, такие как обработка биомассы, например, деградация полимеров биомассы с превращением их в ферментируемые сахара; и ферментирование сахаров с превращением их в ценные метаболиты или продукты.

Таким образом, эти бактерии по данному изобретению демонстрируют комбинацию замечательных и неожиданных свойств, касающихся утилизации субстрата, продуцирования метаболитов и геномного разнообразия, особенно полезного для промышленных целей.

Важно понимать, что с помощью изучения настоящего изобретения и следуя экспериментальным процедурам, описанным, например, в экспериментальном разделе, можно отобрать или выделить другие бактерии, такие как бактерии *Deinococcus*, обладающие свойствами, соответствующими настоящему изобретению. В частности, когда авторы изобретения показали, что *Deinococcus* или родственные бактерии имеют большой геном и высокое геномное разнообразие, специалисты, следуя протоколам, представленным в экспериментальном разделе, могут выделить другие штаммы с такими же свойствами.

В этом смысле следующим объектом данного изобретения является способ выделения бактерий, включающий

обеспечение образца, потенциально содержащего бактерии;

воздействие на упомянутый образец облучением;

выделение растущих или живых бактерий из упомянутого облученного образца и

отбор из упомянутых растущих или живых бактерий тех бактерий, которые имеют геном размером более 3,9 мегабаз.

Данный способ можно осуществлять с разными образцами, содержащими не охарактеризованные бактерии, в частности с образцами, полученными из окружающей среды или их производными. В контексте данного изобретения образцы из окружающей среды включают любые образцы, содержащие (множество) не охарактеризованных (микро)организмов, особенно, не культивированные микроорганизмы (например, микроорганизмы, которые не были целенаправленно культивированы и размножены в выделенной форме). Образец может быть получен или образован из природной среды или из искусственных или специально созданных сред.

Как отмечалось, образец может быть любым природным образцом, приготовленным или образованным из почвы, воды, растительного экстракта, биологического материала, осадочных пород, торфяников, промышленных сточных вод, промышленных участков, экстрактов минералов, песка и т.п. Образец может быть собран из различных регионов или при различных условиях, не ограничиваясь тропическими регионами, вулканическими регионами, лесами, фермами, промышленными районами и т.д. Образец обычно содержит различные виды микроорганизмов (не охарактеризованных, ранее не культивированных), таких как почвенные микроорганизмы, морские микроорганизмы, пресноводные микроорганизмы, симбиотические микроорганизмы, и т.д. Виды таких природных микроорганизмов включают бактерии, водоросли, грибы, дрожжи, плесневые грибки, вирусы и т.д. Микроорганизмы могут включать экстремофильные организмы, например термофилы. Образец обычно содержит различные виды таких

(не культивированных) микроорганизмов, а также различные их количества. Кроме того, образец может содержать известные и/или ранее культивированные микроорганизмы (например, прокариоты или эукариоты).

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено тем или иным определенным типом образца или природным микроорганизмом, но может быть применимо для любого образца, содержащего некультивированные микроорганизмы.

В предпочтительном воплощении образец приготовлен или образован из почвы, воды, горячих источников, морской среды, грязи, дерева, камня, лишайника, растительного экстракта, биологического материала, осадочной породы, биопленки, промышленных сточных вод, газа, песка, масла, нечистот или испражнений животных или человека.

Для целей настоящего изобретения образец может быть сырым, сухим, в виде суспензии, пасты и т.д. Кроме того, перед этапом b) этого способа образец может быть обработан для улучшения процесса, например, для обогащения его микроорганизмами, например, с помощью фильтрации, отмывания, концентрирования, разбавления, перемешивания, высушивания и т.д.

В определенном воплощении образец находится в форме профильтрованной суспензии. Более предпочтительно образец может быть стерилизован фильтрацией и /или помещен в стерильную воду перед обработкой по этапу b).

Этап b) процесса включает воздействие на образец (т.е. на микроорганизмы, содержащиеся в образце), повреждающей ДНК и разрушительной для клетки обработкой, предпочтительно воздействием облучения, в частности повторяющимся воздействием облучением.

Разрушительная для клетки повреждающая ДНК обработка представляет собой обработку, вызывающую гибель значительной части клеток в образце в отличие от простой мутагенной обработки, вызывающей модификации ДНК. В частности, повреждающая ДНК разрушительная для клетки обработка - это обработка, достаточная для того, чтобы вызвать гибель 90% или больше клеток в культуре бактерий *E.coli*. Даже более предпочтительно повреждающая ДНК разрушительная для клетки обработка - это обработка, достаточная для того, чтобы уменьшить титр бактерий в культуре *E.coli* по меньшей мере в 2 log. Авторы изобретения, действительно, показали, что использование повреждающей ДНК разрушительной для клетки обработки позволяет выделить и отобрать с высокой эффективностью представленные в малом количестве бактерии, производящие ценные метаболиты.

Обработка предпочтительно включает воздействие на образец облучением в течение периода времени, достаточного для того, чтобы вызвать гибель значительной части присутствующих в образце микроорганизмов.

В предпочтительном воплощении обработка включает воздействие на образец облучением один или несколько раз. Предпочтительная обработка включает повторяющееся (например, чередующееся) воздействие на образец (т.е. микроорганизмы в образце) облучением.

Характер облучения может быть выбран из ультрафиолетового (UV), гамма и/или рентгеновского облучения, либо одного типа, либо в комбинации, наиболее предпочтительно ультрафиолетового облучения. Обработка облучением обычно включает воздействие на микроорганизмы облучением один раз или несколько (например, от 1 до 5) раз, причем облучение может быть одинаковой или разной природы, предпочтительно одинаковой природы. Повторяющуюся обработку облучением обычно выполняют с интервалом между 1 и 8 ч, предпочтительно от 3 до 5 ч и более предпочтительно приблизительно 4 ч.

Особенно предпочтительно обработка включает воздействие на образец ультрафиолетом. Действительно, изобретение показывает, что такая обработка позволяет с высокой эффективностью выделить из образцов окружающей среды (например, почвы или воды) представленные в малом количестве разновидности бактерий, производящие ценные метаболиты. Обработка облучением обычно между 0,5 и 400 мДж/см², более предпочтительно между 1 и 200 мДж/см², как правило, между 1 и 100 мДж/см² в течение периода времени от приблизительно 5" до 5'. Предпочтительная доза ультрафиолетового (UV) облучения равна 4 мДж/см².

В специфическом воплощении обработка включает по меньшей мере двукратное, предпочтительно по меньшей мере трехкратное облучение образца ультрафиолетом с дозой от 0,5 до 400 мДж/см² каждое, предпочтительно приблизительно 4 мДж/см² каждое, выполняемое с интервалом между 1 и 8 ч, предпочтительно от 3 до 5 ч и более предпочтительно приблизительно 4 ч.

Во время обработки образец предпочтительно помещают в подходящую культуральную среду, такую как без ограничений PGY (бактопептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, глюкоза 20 г/л) или LB (бактотриптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 2,5 г/л, хлорид натрия 10 г/л). Следует понимать, что специалистам известны другие культуральные среды (Buchanan et al., 1974, Difco, 1995) или они могут быть приготовлены специалистами из таких известных сред.

Этап обработки b) обычно осуществляют на твердой или полутвердой культуральной среде, например, в присутствии геля (агар). Наиболее предпочтительная для обработки среда содержит агаровую культуральную среду, такую как мягкая агаровая культуральная среда. В особом воплощении для роста бактерий используют TGY агаровую среду. Однако можно использовать также другую твердую среду, содержащую источник углерода, источник азота и минеральные соли. Техники повторных разбавлений

могут также применяться согласно Schoenborn et al. 2004.

На этапе с) жизнеспособные или растущие бактерии идентифицируют или выделяют из обработанного образца. Жизнеспособные или растущие бактерии могут быть идентифицированы разными способами, известными специалистам в данной области. В конкретном воплощении идентифицируют колонии, образующиеся в культуральной среде. Жизнеспособные или растущие бактерии могут быть выделены, и затем помещены в свежую среду, для дальнейшего культивирования или роста.

Этап d) включает отбор одной или нескольких бактерий с желаемым размером генома. Этот отбор может быть осуществлен с помощью различных техник, известных специалистам, таких как электрофорез в пульсирующем поле, гибридизация ДНК с определением степени ренатурации Cot1/2, или секвенирование генома.

В следующем воплощении данное изобретение относится к способу выделения бактерии по данному изобретению, включающему:

- а) обеспечение образца, содержащего бактерии *Deinococcus*;
- б) определение размера генома бактерий в упомянутом образце и
- с) отбор из упомянутого образца одного или нескольких штаммов бактерий *Deinococcus* с размером генома более 3,9 Мб, предпочтительно более 4,0, более 4,2, более 4,5 или даже более 5 Мб.

Открытие существования таких бактерий было совершенно неожиданным, имея в виду, что средний размер генома штаммов *Deinococcus* равен приблизительно 3,0 Мб.

В частном случае настоящего изобретения упомянутый выше способ включает также этап определения уровня геномного разнообразия в упомянутых бактериях и отбор бактерий с геномным разнообразием более 15%, более предпочтительно 25, 30, 40 или даже более 50%. Это свойство особенно замечательно, поскольку присутствие разного генетического материала придает бактерии широкий спектр свойств и активностей.

В этом смысле изобретение относится также к способу выделения бактерии по данному изобретению, причем способ включает:

- а) обеспечение образца, содержащего бактерии *Deinococcus*;
- б) определение геномного разнообразия бактерий в упомянутом образце и
- с) отбор из упомянутого образца одной или нескольких бактерий *Deinococcus*, имеющих геномное разнообразие больше 15%, более предпочтительно более 25, 30, 40 или даже более 50%.

Далее бактерии могут быть выбраны или сконструированы для проявления упомянутых выше дополнительных свойств, а именно производства метаболитов, лекарственных средств, ферментов, модификации биомассы и т.д.

Отбор или идентификация бактерий, вырабатывающих выбранные метаболиты, могут быть выполнены способами, известными специалистам. В конкретном воплощении идентифицированные или выделенные бактерии могут быть экспонированы с одной или несколькими индикаторными клетками, после чего выбирают бактерию, влияющую на жизнеспособность, рост, метаболизм, подвижность, экспрессию РНК, экспрессию белка, секрецию белка или производство вируса по крайней мере одной из упомянутых индикаторных клеток.

В случае антибиотических или антибиостатических агентов индикаторные клетки являются типичными референсными бактериальными штаммами, и позволяют тестировать бактерии, которые ингибируют рост или убивают упомянутые референсные штаммы.

В случае так называемых противовирусных соединений индикаторные клетки являются типичными производящими вирус клетками, и позволяют тестировать бактерии, которые влияют на производство вирусов или на жизнеспособность инфицированных вирусами клеток.

В следующем аспекте настоящего изобретения бактерии культивируют в специальных температурных условиях, чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены в интервале температур приблизительно от 4 до 70°C. Более конкретно, бактерии поддерживают при выбранной температуре на этапе b), c) и/или d); и/или в течение дополнительного этапа e), чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены при желаемой температуре.

В следующем воплощении настоящего изобретения бактерии культивируют в специальных солевых условиях, чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены в условиях определенной концентрации NaCl или аналогичных солей, возможно достигающей приблизительно 5% вес./об. Более конкретно, бактерии поддерживают при выбранной солености на этапе b), c) и/или d), и/или в течение дополнительного этапа e), чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены при желаемой солености.

Кроме того, в следующем и предпочтительном воплощении настоящего изобретения бактерии культивируют в специальных условиях pH, чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены в интервале значений pH приблизительно между 3 и 9,5, предпочтительно между 4 и 8. Более конкретно, бактерии поддерживают в выбранном интервале pH на этапе b), c) и/или d); и/или в течение дополнительного этапа e), чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены при желаемом значении pH.

Кроме того в следующем воплощении настоящего изобретения бактерии культивируют в специальных условиях оксигенации, чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены в аэробных и/или анаэробных условиях. Более конкретно, бактерии поддерживают в выбранных условиях оксигенации на этапе b), c) и/или d); и/или в течение дополнительного этапа e), чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены при желаемых условиях.

Кроме того, в следующем воплощении настоящего изобретения бактерии культивируют в специальной культуральной среде, чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены в присутствии выбранных источников углерода. Более конкретно, бактерии поддерживают в условиях среды на этапах b), c) и/или d); и/или в течение дополнительного этапа e), чтобы идентифицировать или выделить жизнеспособные бактерии, которые могут быть выращены при желаемых источниках углерода.

Следует понимать, что перечисленные выше характеристики могут быть выбраны индивидуально или в любых комбинациях. Например, способ может быть применен для идентификации жизнеспособных бактерий, которые могут быть выращены при желаемой температуре и солености или при желаемой температуре и pH или при желаемой температуре и условиях оксигенирования.

Кроме того, способы по данному изобретению могут включать следующий этап модификации, например, биологической, генетической и/или химической, бактерий или их ДНК с помощью любого процесса, известного в технике, причем упомянутая модификация направлена на улучшение, например, жизнеспособности, роста или функционирования упомянутой бактерии для улучшения, например, антибиотической активности. Такой модифицирующий этап включает без ограничений, слияние клеток, ускоренную эволюцию, перестановку в ДНК, мутагенез, включение эукариот, прокариот или синтетической нуклеиновой кислоты (например, ДНК) из другого штамма или любую генно-инженерную технику. Модификация может также включать этап введение маркерного гена (например, гена устойчивости к канамицину) в бактерию.

Отбор бактерий, способных модифицировать биомассу, может осуществляться путем экспонирования бактерий с биомассой и отбора клеток, которые вызывают разложение биомассы, и/или отбора клеток, которые могут использовать определенные источники углерода, такие как лигнин, ксилан, целлюлозу и т.д.

Следующим объектом целью изобретения является получение экстракта вышеописанной бактерии. "Экстракт бактерии" означают любую фракцию, полученную из бактерии, такую как клеточный супернатант, клеточные обломки, клеточные стенки, экстракт ДНК, ферменты или препараты ферментов или любые препараты, полученные из бактерий путем химической, физической и/или ферментативной обработки, которая по существу не содержит живых бактерий.

Изобретение относится также к производным, трансформантам, мутантам или потомству бактерии, описанной выше. Термин "трансформант" означает штамм, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту (т.е. нуклеиновую кислоту, которая исходно не присутствует в упомянутой бактерии или которая была изменена или дуплицирована). Термин мутант означает штамм, который образуется при мутагенной обработке. Производные обозначают любой штамм, полученный из штамма по настоящему изобретению, например, с помощью отбора, который сохраняет большой геном и/или значительное геномное разнообразие.

Следующий объект изобретения относится к применению описанной выше бактерии для производства органической кислоты или спирта.

Следующий объект изобретения относится к применению описанной выше бактерии для получения биоспиртов, предпочтительно этанола.

Изобретение, кроме того, относится к способу получения спирта, предпочтительно этанола, включающему культивирование бактерии, как это было определено выше в присутствии соответствующего субстрата и сбор спирта.

Субстрат может быть любой культуральной средой или различными типами биомассы или продуктами, полученными из нее. В частности, упомянутые кислоты и спирты могут быть образованы из возобновляемых источников, особенно растительной или животной биомассы или из городских и промышленных отходов.

В частности, объектом настоящего изобретения является способ производства биоалкоголя, включающего экспонирование биомассы с бактерией по данному изобретению или с ее экстрактом и, необязательно, сбор биоалкоголя.

Биоалкоголь - это предпочтительно этанол.

Способ по изобретению может быть осуществлен в реакторе с конверсией. "Реактор" означает традиционный ферментер или любое приспособление или систему для превращения биомассы, специально приспособленный для осуществления изобретения и состоящий поэтому из собственно биореакторов, биофильтров, ротационных биологических контакторов и других биореакторов газовой и/или жидкой фазы, особенно таких, которые адаптированы к обработке биомассы или производных биомассы. Аппаратура, которую можно использовать по данному изобретению, может применяться при непрерывном

культивировании или при периодической ферментации.

В реакторе для осуществления способа по данному изобретению, используют по меньшей мере одну бактерию по данному изобретению или бактериальный экстракт, пока упомянутый реактор настроен и оборудован таким образом, что в нем установлены и поддерживаются такие физико-химические условия, что упомянутая бактерия может функционировать, и поэтому при желании в нем возможен и предпочтительно обеспечивается бактериальный рост.

Процесс может быть проведен в условиях аэробноза, анаэробноза или микроаэробноза в зависимости от субстрата и бактерии.

Дальнейшие аспекты и преимущества изобретения будут описаны в следующих примерах, которые следует рассматривать как иллюстративные и не ограничивающие рамок данного патента.

Примеры

А. Материалы.

Культуральная среда.

167 среда Thetmus.

Триптон	1	г
Дрожжевой экстракт	1	г
Агар	28	г
Нитрилтриуксусная кислота	100	мг
CaSO ₄ × 2 H ₂ O	40	мг
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	200	мг
0,01 М Fe цитрат	0,5	мл
Раствор следовых элементов (см. ниже)	0,5	мл
Фосфатный буфер (см. ниже)	100	мл
H ₂ O	900	мл
Довести до pH 7,2 с помощью NaOH, автоклавировать при 121°C в течение 15 мин., отдельно автоклавировать фосфатный буфер и добавить к среде		

Фосфатный буфер.

KH ₂ PO ₄	5,44	Г
Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	43	Г
H ₂ O	1000	МЛ
Довести до pH 7,2		

Минимальная среда.

MOPS Буфер.

MOPS acid	400	мМ
NH ₄ Cl	200	мМ
NaOH	100	мМ
KOH	100	мМ
CaCl ₂	5	мМ
K ₂ SO ₄	276	мМ
MgCl ₂	5,28	мМ
pH 7, отфильтрованный, стерилизованный		

В эту среду добавляют соответствующий источник углерода (глюкоза (от 0,1 до 10%) карбоксиметилцеллюлоза (от 0,1 до 10%), ксилан (от 0,1 до 10%), ксилоза (от 0,1 до 10%) ...).

В. Выделение устойчивых к ультрафиолету бактерий из образцов воды.

Образцы воды концентрировали фильтрацией через 0,22-мкм нитроцеллюлозный фильтр (Millipore, Франция), затем помещали в суспензию в 10 мл стерильной воды. Профильтрованный раствор затем обрабатывали ультразвуком в течение приблизительно 60 с для ресуспендирования бактерий.

После обработки ультразвуком 150 мкл - 2 мл суспензии, ее наносят на твердую обогащенную PGY-агаром культуральную среду, стерилизованную автоклавированием (20 мин при 120°C), содержащую глюкозу (Sigma-Aldrich, Франция) 1 г/л, пептон (Fluka, Франция) 10 г/л и дрожжевой экстракт (Fluka, Франция) 5 г/л. Засеянную культуральную среду затем подвергают 3-кратной обработке 4 мДж/см² UV с помощью BLX-E254 biolink (Vilber-Lourmat, Франция), выполненной с 4-часовым интервалом. После инкубации при температуре от 30 до 50°C в течение от 3 до 4 дней, были видны жизнеспособные представляющие интерес колонии.

С. Выделение устойчивых к UV бактерий из образцов дерева и камня.

Образцы дерева и камня погружали в стерильную воду, затем в течение 60 с интенсивно размешивали и обрабатывали ультразвуком.

После обработки 150 мкл - 2 мл суспензии ультразвуком, ее наносят на твердую обогащенную PGY-агаром культуральную среду, стерилизованную автоклавированием (20 мин при 120°C), содержащую глюкозу (Sigma-Aldrich, Франция) 1 г/л, пептон (Fluka, Франция) 10 г/л и дрожжевой экстракт (Fluka, Франция) 5 г/л. Засеянную культуральную среду затем подвергают 3-кратной обработке 4 мДж/см² UV с помощью BLX-E254 biolink (Vilber-Lourmat, Франция), причем каждую выполняли с

интервалом 4 ч. После инкубации при температуре от 30 до 50°C в течение от 3 до 4 дней, были видны жизнеспособные представляющие интерес колонии.

Д. Идентификация мега-Deinococcus.

2 мл устойчивых к ультрафиолету розовых бактериальных культур получали через 3 дня роста при 45°C на богатой среде. Наблюдения с помощью микроскопа показали, что культуры состоят из сферических клеток. Из этих клеток экстрагировали ДНК следующим образом: После центрифугирования 400 мкл культуры при 8000g в течение 5 мин удаляли супернатант. Осадок суспендировали в 100 мкл стерильной воды и 40 мкл EDTA в концентрации 12,5 mM. После инкубации при 37°C в течение 1 ч добавляли 10 мкл NaOH при концентрации 0,1 M. Препарат затем нагревали при 100°C в течение 5 мин. После центрифугирования при 8000g в течение 3 мин собирали супернатант (100-150 мкл) и разбавляли его об/об стерильной водой.

Чтобы обнаружить термофильные Deinococci, амплифицировали участок 16S рДНК размером 158 ПО с помощью праймеров DeinoF1 (5'GTT ACC CGG AAT CAC TGG GCG TA3' - SEQ ID NO: 1) и DeinoR3 (5'GGT ATC TAC GCA TTC CAC CGC TA3' - SEQ ID NO: 2). 50 мкл PCR смеси состояло из 2 ед Taq полимеразы, 5 мкл буфера Taq, содержащего MgCl₂, 0,5 мкл dNTP при 10 mM, 2,25 мкл каждого праймера при 10 мкM, 0,5 мкл ДНК и стерильной H₂O до 50 мкл.

Программа полимеразной цепной реакции PCR - это начальный этап денатурации в течение 5 мин при 95°C, 30 циклов денатурации в течение 30 с при 94°C, ренатурация в течение 30 с при 70°C и элонгация 45 с при 72°C, сопровождаемое конечной элонгацией 10 мин при 72°C.

5 мкл продуктов PCR наносили на 1% агарозный гель, содержащий бромистый этидий. Полосы PCR визуализировали под ультрафиолетом. Присутствие основной полосы размером 158 ПО указывает на то, что продукт PCR соответствует части 16S рДНК Deinococcus.

На фигуре представлены результаты амплификации фрагмента размером 158 ПО у бактерии, которые были выделены из обработанного образца.

Геномную ДНК экстрагировали с помощью тканевого набора Macherey-Nagel NucleoSpin®. Затем геномную ДНК подвергали секвенированию с помощью техники Solexa (Solexa inc. BioTechniques, December 2006: p29). Мы получили покрытие от 100 до 250, имея от 5×10⁶ до 15×10⁶ считываний.

Затем определяли размер бактериального генома. Бактерии, обладающие неожиданно большими геномами, описаны в приведенной ниже табл. 1 в сравнении с референсными бактериями.

Таблица 1

	Размер генома
Deinococcus geothermalis DSM 11300	3247018
Deinococcus radiodurans R1	3284088
M1-3H	4031129
M23r-2A	3619528

Бактерии Deinococcus подвергали обработке 4 мДж/см² UV и культивировали в содержащей рифампицин среде (от 10 до 100 мкг/мл). Бактерии, способные расти на рифампицине, затем выделяли и определяли размер их генома, как было описано выше.

Идентифицировали и выделяли Deinococcus DRH048, имеющие размер генома приблизительно 5980 мегабаз.

Е. Идентификация ксено-Deinococcus.

Геномные вариации в близко родственных видах не могут быть объяснены только вертикальным наследованием, и ГПГенов следует считать важным эволюционным фактором. ГПГенов - это приобретение любым геномом чужеродных генов путем трансформации, трансдукции или конъюгации. Предполагают наличие ГПГенов, если последовательность генов или белка из определенного организма имеет большее сходство с гомологичной последовательностью из очень отдаленного организма, чем из очевидно более близко родственных организмов. Определяли уровень геномного разнообразия в идентифицированных бактериальных штаммах, и соответствующие данные представлены в следующей табл. 2.

Таблица 2

	Происхождение ГПГена	Тип	Геномное разнообразие, в %
M1-3H	-Burkholderia pseudomalle -Herpetosiphon aurantiacus -Syntrophobacter fumaroxidans -Rubrobacter xylanophilus -Frankia sp	Beta Proteobacteria -Chlorofexi -Delta proteobacteria -Actinobacteria -Actinobacteria	18
M23r-2A	-Burkholderia pseudomalle -Verminephrobacter eiseniae -Acidovorax avenae -Polaromonas sp -Frankia sp	Beta Proteobacteria - Beta proteobacteria -Beta proteobacteria -Beta proteobacteria -Actinobacteria	28

DRH38	-Burkholderia pseudomalle -Anthrobacter sp -Pelotomaculum thermopropionicum - Polaromonas sp - Frankia sp	Beta Proteobacteria - Actinobacteria -Firmicute -Beta proteobacteriaa -Actinobacteria	9
M11-12B	-Burkholderia pseudomalle -Herpetosiphon aurantiacus - Chloroflexus aggregans - Aromatoleum aromaticum - Physcomitrella patens	Beta Proteobacteria - Chloroflexi - Chloroflexi -beta proteobacteriaa -Bryophyte	16
DRH048	-Burkholderia pseudomalle -Herpetosiphon aurantiacus -Paenibacillus sp. - Myxococcus xanthus - Nostoc punctiforme	Beta Proteobacteria - Chloroflexi -Firmicute -delta proteobacteriaa -cyanobacteria	64

В дополнение к высокому уровню геномного разнообразия, авторы изобретения открыли также, что бактерии мега-Deinosoccus содержат повышенное число и повышенное разнообразие генов, участвующих в энергетическом метаболизме. В сравнении с бактериями Deinosoccus, имеющими постоянный размер генома, некоторые исследованные бактерии мега-Deinosoccus обнаруживают по меньшей мере на 15%, более предпочтительно по меньшей мере на 25, 40% или даже по меньшей мере на 50% больше генов, участвующих в энергетическом метаболизме. Такое повышенное число генов придает бактериям более полезные свойства,

F. Свойства бактерий мега-Deinosoccus.

Бактерии по данному изобретению, имеющие мегагеном и/или высокий уровень геномного разнообразия, исследовали в разных условиях, чтобы оценить их функциональные свойства.

Результаты показывают, что такие бактерии, действительно, имеют улучшенную биологическую активность, которая коррелирует с размером их генома и его разнообразием. В частности, 21 бактерию культивировали в определенной среде в присутствии разных источников углерода и проверяли их способность к эффективному росту. Одна из этих проверенных бактерий была бактерия мега-Deinosoccus DRH048, в то время как другие 20 имели размер генома меньше 3,5 Мб.

Полученные результаты показывают, что бактерия мега-Deino - единственная способная утилизировать все проверенные комплексы и различные субстраты в качестве источников углерода, а именно глюкозу, СМС, целлобиозу, ксилан, ксилозу, глицерин, сахарозу, крахмал, фруктозу, пептон, инулин и волокнистую целлюлозу. Отметим, что DRH048 - единственная бактерия, способная использовать СМС.

Бактерия мега-Deinosoccus была способна также разлагать ватмановскую бумагу (волокнистую целлюлозу), в то время как только 15% Deinosoccus с нормальным размером генома положительно реагировала на этот тест.

мега-Deinosoccus бактерия была также способна использовать в качестве источника углерода инулин, в то время как только 5% Deinosoccus с нормальным размером генома положительно реагировали на этот тест.

Существенно то, что только бактерии мега-Deinosoccus способны использовать все проверенные сложные источники углерода, такие как инулин и волокнистая целлюлоза. 0% проверенных бактерий Deinosoccus с нормальным размером генома положительно реагировали на эти два теста.

Бактерия мега-Deinosoccus могла также расти в культуральной среде, не содержащей биотин, ниацин, пиридоксин, тиамин, витамин B12, а также в среде, не содержащей витаминов.

Бактерия мега-Deinosoccus могла также использовать все проверенные источники азота, включая NH_4Cl , мочевины, NaNO_3 , NaNO_2 и глутамат.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение бактерии Deinosoccus, имеющей размер генома более 3,9 мегабаз и содержащей 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, для получения органической кислоты, спирта, рекомбинантного белка, фермента, антибиотика, бактериостатического соединения или противогрибкового агента.

2. Применение по п.1, где указанная бактерия имеет размер генома более 4,0 мегабаз.

3. Применение по п.1, где указанная бактерия имеет размер генома более 4,5 мегабаз.

4. Применение по п.1, где указанная бактерия имеет размер генома более 5,0 мегабаз.

5. Применение по любому из пп.1-4, где указанная бактерия отличается геномным разнообразием, превосходящим 15%.

6. Применение по любому из пп.1-5, где указанная бактерия отличается геномным разнообразием, превосходящим 25%.

7. Применение по любому из пп.1-6, где указанная бактерия отличается геномным разнообразием, превосходящим 50%.

8. Применение по любому из пп.1-7, где указанная бактерия мезофильна, жизнеспособна при значениях pH от 4 до 9 и/или жизнеспособна в присутствии 2% этанола.

9. Применение по любому из пп.1-8, где указанная бактерия способна к росту в аэробных или анаэробных условиях.

10. Применение по любому из пп.1-9, где указанная бактерия может использоваться в качестве источника углерода лигнин, целлюлозу, гемицеллюлозу, крахмал, ксилан, ксилозу, сахарозу или глюкозу или их производные.

11. Применение по любому из пп.1-10, где указанная бактерия получена способом, содержащим следующие этапы:

- а) обеспечение образца из окружающей среды, содержащего бактерии *Deinococcus*;
- б) определение размера генома бактерий в указанном образце и
- с) отбор из указанного образца одной или нескольких бактерий *Deinococcus* с размером генома более 3,9, более 4,0, более 4,2, более 4,5 или более 5 мегабаз.

12. Применение не содержащего живые клетки экстракта бактерии *Deinococcus* для получения органической кислоты, спирта, рекомбинантного белка, фермента, антибиотика, бактериостатического соединения или противогрибкового агента, причем указанная бактерия *Deinococcus* имеет размер генома более 3,9 мегабаз и содержит 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, при этом указанный экстракт выбран из клеточного супернатанта, экстракта клеточных обломков, экстракта клеточных стенок и экстракта, содержащего ДНК, причем указанный экстракт получен путем химической, физической и/или ферментативной обработки бактериальных клеток.

13. Применение бактерии *Deinococcus*, имеющей размер генома более 3,9 мегабаз и содержащей 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, для разложения биомассы.

14. Применение не содержащего живые клетки экстракта бактерии *Deinococcus* для разложения биомассы, причем указанная бактерия *Deinococcus* имеет размер генома более 3,9 мегабаз и содержит 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, при этом указанный экстракт выбран из клеточного супернатанта, экстракта клеточных обломков, экстракта клеточных стенок и экстракта, содержащего ДНК, причем указанный экстракт получен путем химической, физической и/или ферментативной обработки бактериальных клеток.

15. Способ производства метаболита, включающий отбор бактерии *Deinococcus*, имеющей размер генома более 3,9 мегабаз и содержащей 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, и которая продуцирует указанный метаболит, культивирование указанной бактерии и получение метаболита из культуральной среды, причем метаболит выбран из органической кислоты и спирта.

16. Способ производства лекарственного средства, включающий отбор бактерии *Deinococcus*, имеющей размер генома более 3,9 мегабаз и содержащей 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, и которая продуцирует указанное лекарственное средство, культивирование указанной бактерии и получение лекарственного средства из культуральной среды, причем лекарственное средство выбрано из антибиотика, бактериостатического соединения и противогрибкового агента.

17. Способ по п.16, где лекарственным средством является антибиотик.

18. Способ производства рекомбинантного белка, включающий отбор бактерии *Deinococcus*, имеющей размер генома более 3,9 мегабаз и содержащей 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, и которая продуцирует указанный белок, культивирование указанной бактерии и получение белка из культуральной среды.

19. Способ получения бактерии *Deinococcus*, имеющей размер генома более 3,9 мегабаз и содержащей 16S рДНК, которая при амплификации с помощью праймеров GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA и GGTATCTACGCATTCCACCGCTA образует фрагмент, включающий примерно 158 пар оснований, причем способ включает следующие стадии:

- а) обеспечение образца из окружающей среды, содержащего бактерии *Deinococcus*;
- б) определение размера генома бактерий в указанном образце и
- с) отбор из указанного образца одной или нескольких бактерий *Deinococcus* с размером генома более 3,9, более 4,0, более 4,2, более 4,5 или более 5 мегабаз.

