

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 910**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)
C12P 7/06	(2006.01)
C12P 7/56	(2006.01)
C12P 7/54	(2006.01)
C12P 3/00	(2006.01)
C12R 1/01	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/EP2012/068627**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12773252 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2758518**

54 Título: **Nuevas bacterias termófilas extremas del género Caldicellulosiruptor**

30 Prioridad:

22.09.2011 US 201161537892 P
22.09.2011 EP 11007706
10.07.2012 US 201261669981 P
10.07.2012 EP 12175679

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2017

73 Titular/es:

DIREVO INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY GMBH
(100.0%)
Nattermannallee 1
50829 Köln, DE

72 Inventor/es:

CURVERS, SIMON y
SVETLICHNYI, VITALY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 638 910 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

Nuevas bacterias termófilas extremas del género *Caldicellulosiruptor*

Campo de la descripción

5 La presente descripción se refiere a nuevas células bacterianas termófilas extremas celololíticas aisladas pertenecientes al género *Caldicellulosiruptor*, a mutantes de las mismas, a cepas aisladas, a cultivos microbianos y a composiciones microbianas. Las nuevas bacterias son particularmente adecuadas para la producción de productos de fermentación tales como etanol y ácido láctico a partir de biomasa lignocelulósica.

Antecedentes

10 En general, los productos de fermentación se producen por la degradación del material que contiene almidón en azúcares fermentables por licuefacción y sacarificación, seguida de la conversión de los azúcares directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado usando un organismo de fermentación.

15 Sin embargo, la industria de producción de productos de fermentación tales como el etanol y el ácido láctico se enfrenta al desafío de redirigir el proceso de producción a partir de la fermentación de materiales almidonables relativamente fácilmente convertibles, pero caros, a la biomasa lignocelulósica compleja, pero barata, tal como la biomasa vegetal.

20 A diferencia del almidón, que contiene polímeros homogéneos y fácilmente hidrolizados, la biomasa lignocelulósica contiene cantidades variables de celulosa, hemicelulosa, lignina y pequeñas cantidades de proteína, pectina, cera y otros compuestos orgánicos. La biomasa lignocelulósica debe entenderse en su sentido más amplio, de modo que aparte de la madera, los residuos agrícolas, los cultivos energéticos también comprenden diferentes tipos de residuos tanto industriales como domésticos. La biomasa celulósica es un vasto recurso mal explotado y, en algunos casos, supone un problema de residuos. Sin embargo, las hexosas de la celulosa pueden ser convertidas por la levadura en etanol combustible para el que existe una demanda creciente. Las pentosas de la hemicelulosa todavía no se pueden convertir en etanol comercialmente, pero se están desarrollando varios microorganismos etanologénicos prometedores con la capacidad de convertir pentosas y hexosas.

25 Por lo general, la primera etapa en la utilización de biomasa lignocelulósica es una etapa de pretratamiento, con el fin de fraccionar los componentes de material lignocelulósico y aumentar su área superficial.

30 El método de pretratamiento más usado es el pretratamiento con vapor, un proceso que comprende calentar el material lignocelulósico por inyección de vapor hasta una temperatura de 130 a 230 °C. Antes o durante el pretratamiento con vapor, se puede añadir opcionalmente un catalizador tal como un ácido mineral u orgánico, o un agente cáustico que facilite la desintegración de la estructura de la biomasa.

Otro tipo de hidrólisis de lignocelulosa es la hidrólisis ácida, en donde el material lignocelulósico se somete a un ácido tal como ácido sulfúrico mediante lo que los polímeros de azúcar celulosa y hemicelulosa se hidrolizan total o parcialmente a sus monómeros de azúcar constituyentes, y la estructura de la biomasa se destruye facilitando el acceso de enzimas hidrolíticas en etapas de procesamiento subsiguientes.

35 Un método adicional es la oxidación en húmedo, en donde el material se trata con oxígeno a 150-185 °C. A cualquiera de los pretratamientos le puede seguir la hidrólisis enzimática para completar la liberación de monómeros de azúcar. Esta etapa de pretratamiento da lugar a la hidrólisis de celulosa en glucosa, mientras que la hemicelulosa se transforma en las pentosas xilosa y arabinosa, y las hexosas glucosa, manosa y galactosa. Así pues, en contraste con el almidón, la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica da lugar a la liberación de azúcares de pentosa además de azúcares de hexosa. Esto implica que los organismos de fermentación útiles necesitan ser capaces de convertir los azúcares de hexosa y pentosa en productos de fermentación deseados tales como etanol.

40 Después del pretratamiento, los esquemas de procesamiento de biomasa lignocelulósica que implican la hidrólisis enzimática o microbiana implican comúnmente cuatro transformaciones mediadas biológicamente: (1) la producción de enzimas sacarolíticas (celulasas y hemicelulasas); (2) la hidrólisis de componentes de hidratos de carbono presentes en la biomasa previamente tratada en azúcares; (3) la fermentación de azúcares de hexosa (p. ej., glucosa, manosa y galactosa); y (4) la fermentación de azúcares de pentosa (p. ej., xilosa y arabinosa).

50 Cada etapa de procesamiento puede hacer que el proceso global sea más costoso y, por lo tanto, disminuir la viabilidad económica de producir biocombustibles o productos químicos a base de carbono a partir de material biológico celulósico. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos que reduzcan el número de etapas de procesamiento necesarias para convertir el material biológico celulósico en biocombustible y otros materiales comercialmente deseables.

Las cuatro transformaciones mediadas biológicamente pueden tener lugar en una sola etapa en una configuración de proceso denominada bioprocesamiento consolidado (CBP), que se distingue de otras configuraciones menos integradas en que el CBP no implica una etapa de proceso dedicada para la producción de celulosa y/o

hemicelulosa. El CBP ofrece el potencial para una mayor eficiencia que los procesos que requieren una producción de celulosa dedicada en una operación unitaria distinta.

Por lo tanto, la disponibilidad de nuevos microorganismos para convertir material de biomasa lignocelulósica en productos químicos basados en carbono sería altamente ventajosa.

5 Compendio de la descripción

La presente invención se refiere a nuevos microorganismos y composiciones útiles para procesar biomasa lignocelulósica. La presente invención está únicamente definida por las reivindicaciones. El término "realizaciones" y la expresión "aspectos de la invención", etc., como se enumeran a continuación, tienen fines meramente ilustrativos.

10 En un primer aspecto, realizaciones de la descripción proporcionan nuevas células bacterianas termófilas celolíticas aisladas pertenecientes al género *Caldicellulosiruptor*, en particular, capaces de producir altos niveles de ácido láctico y/o etanol a partir de material de biomasa lignocelulósica. Las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de *Caldicellulosiruptor* sp. que comprende un ADNr 16S con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7, u homólogos de las mismas.

15 En un aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp., DIB041C de *Caldicellulosiruptor* sp., DIB087C de *Caldicellulosiruptor* sp., DIB101C de *Caldicellulosiruptor* sp., DIB103C de *Caldicellulosiruptor* sp., DIB104C de *Caldicellulosiruptor* sp. o DIB107C de *Caldicellulosiruptor* sp., cada una caracterizada respectivamente por tener una secuencia de ADNr 16S al menos del 99 al 100 %, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 como se indica en la tabla 1.

20 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una cepa aislada que comprende una célula de *Caldicellulosiruptor* sp. según cualquiera de los aspectos anteriores.

25 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp. depositada como DSM 25177, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp.

En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB041C de *Caldicellulosiruptor* sp. depositada como DSM 25771, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB041C de *Caldicellulosiruptor* sp.

30 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB087C de *Caldicellulosiruptor* sp. depositada como DSM 25772, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB087C de *Caldicellulosiruptor* sp.

En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB101C de *Caldicellulosiruptor* sp. depositada como DSM 25178, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB101C de *Caldicellulosiruptor* sp.

35 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB103C de *Caldicellulosiruptor* sp. depositada como DSM 25773, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB103C de *Caldicellulosiruptor* sp.

40 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB104C de *Caldicellulosiruptor* sp. depositada como DSM 25774, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB104C de *Caldicellulosiruptor* sp.

En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB107C de *Caldicellulosiruptor* sp. depositada como DSM 25775, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB107C de *Caldicellulosiruptor* sp.

45 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método de producción de un producto de fermentación que comprende cultivar una célula según la descripción o una cepa según la descripción en condiciones adecuadas.

50 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos para convertir material de biomasa lignocelulósica en un biocombustible u otro producto químico basado en carbono, que comprenden la etapa de poner en contacto el material de biomasa lignocelulósica con un cultivo microbiano durante un periodo de tiempo a una temperatura inicial y a un pH inicial, produciendo así una cantidad de un biocombustible y/u otros productos basados en carbono; en donde el cultivo microbiano comprende un microorganismo extremadamente termófilo del género *Caldicellulosiruptor*, en particular, todos los microorganismos de la cepa *Caldicellulosiruptor* sp. enumerados en la Tabla 1 con sus respectivos números de deposición, microorganismos derivados de cualquiera de estas cepas, o mutantes u homólogos de los mismos.

5 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos de fabricación de etanol a partir de material de biomasa, en donde el método comprende combinar un cultivo microbiano y la biomasa en un medio; y fermentar la biomasa en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir etanol, en un proceso de una sola etapa como parte de un sistema de bioprocesamiento consolidado (CBP), con una célula, una cepa, un cultivo microbiano y/o un microorganismo según la presente descripción en condiciones adecuadas.

10 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos de fabricación de ácido láctico a partir de material de biomasa, en donde el método comprende combinar un cultivo microbiano y la biomasa en un medio; y fermentar la biomasa en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir ácido láctico, una sal o un éster del mismo, en un proceso de una sola etapa como parte de un sistema de bioprocesamiento consolidado (CBP), con una célula, una cepa, un cultivo microbiano y/o un microorganismo según la presente descripción en condiciones adecuadas.

15 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos de fabricación tanto de etanol como de ácido láctico a partir de material de biomasa, en donde el método comprende combinar un cultivo microbiano y la biomasa en un medio; y fermentar la biomasa en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir etanol y ácido láctico, una sal o un éster del último, en un proceso de una sola etapa como parte de un sistema de bioprocesamiento consolidado (CBP), con una célula, una cepa, un cultivo microbiano y/o un microorganismo según la presente descripción en condiciones adecuadas.

20 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos de fabricación de etanol y/o de ácido láctico a partir de material de biomasa, en donde el método comprende combinar un cultivo microbiano y la biomasa en un medio; y fermentar la biomasa en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir etanol y/o ácido láctico, una sal o un éster del último, en un proceso de una sola etapa como parte de un sistema de bioprocesamiento consolidado (CBP), con una célula, una cepa, un cultivo microbiano y/o un microorganismo según la presente descripción en condiciones adecuadas en combinación con la aplicación de un método adecuado para eliminar *in situ* ambos o cualquier producto de fermentación del caldo de fermentación. Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, destilación, destilación mediada, extracción y precipitación.

Además, las realizaciones de la presente descripción se refieren a composiciones para convertir biomasa lignocelulósica o un cultivo microbiano que comprenda una célula, una cepa o un microorganismo según la presente descripción.

30 Además, las realizaciones de la presente descripción se refieren al uso de una célula, una cepa, un microorganismo y/o un cultivo microbiano según la presente descripción para la producción de ácido láctico, una sal o un éster del mismo, o para la producción de etanol.

35 Antes presentar la descripción en detalle, se ha de entender que la presente descripción no se limita a las partes componentes particulares de los dispositivos descritos o a las etapas del proceso de los métodos descritos, pues dichos dispositivos y métodos pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria es con fines meramente descriptivos de las realizaciones particulares y no pretende ser limitante. Debe observarse que, como se emplean en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en singular y/o en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, se ha de entender que, en el caso de que se den intervalos de parámetros que estén delimitados por valores numéricos, se considera que los intervalos incluyen estos valores de limitación.

40 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 ilustra un árbol filogenético basado en genes de ADNr 16S para todas las cepas de *Caldicellulosiruptor* sp. comprendidas en la invención como se enumeran en la Tabla 1.

La FIG. 2 muestra un ADNr 16S de célula DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp.

La FIG. 3 muestra un ADNr 16S de célula DIB041C de *Caldicellulosiruptor* sp.

45 La FIG. 4 muestra un ADNr 16S de célula DIB087C de *Caldicellulosiruptor* sp.

La FIG. 5 muestra un ADNr 16S de célula DIB101C de *Caldicellulosiruptor* sp.

La FIG. 6 muestra un ADNr 16S de célula DIB103C de *Caldicellulosiruptor* sp.

La FIG. 7 muestra un ADNr 16S de célula DIB104C de *Caldicellulosiruptor* sp.

La FIG. 8 muestra un ADNr 16S de célula DIB107C de *Caldicellulosiruptor* sp.

50 La FIG. 9 muestra un gráfico que indica la producción de etanol y ácido láctico por DIB004C durante el crecimiento en pasto de *Miscanthus* pretratado con vapor.

La FIG. 10 muestra una tabla que indica los datos de rendimiento de todas las cepas enumeradas en la Tabla 1 y

cepa de referencia DSM8903 de *C. saccharolyticus* durante el cultivo sobre celulosa, celobiosa, glucosa, xilano, xilosa y biomasa lignocelulósica pretratada.

La FIG. 11 muestra una tabla que indica los datos de rendimiento de las cepas DIB004C y DIB101C sobre diversos tipos de biomasa lignocelulósica pretratada.

5 Descripción detallada de la presente descripción

La presente descripción se refiere a métodos, microorganismos y composiciones útiles para procesar biomasa lignocelulósica. La descripción se refiere, en ciertos aspectos, a microorganismos que son capaces de convertir biomasa lignocelulósica tal como, por ejemplo, pastos de *Miscanthus*, en productos solubles que pueden ser usados por el mismo o por otro microorganismo para producir un producto económicamente deseable tal como, por ejemplo, un biocombustible (por ejemplo, un alcohol y/o gas de hidrógeno (H₂)), polímero o producto químico a base de carbono como el ácido láctico.

La aplicación de dicha tecnología tiene el potencial de hacer más económicamente factible la producción de compuestos químicos y biocombustibles a base de carbono, y de permitir que una selección más amplia de microorganismos utilice biomasa recalcitrante. El uso de materiales celulósicos como fuentes de bioenergía está actualmente limitado por requerir normalmente el preprocesamiento del material celulósico. Dichos métodos de preprocesamiento pueden ser costosos. Por lo tanto, los métodos que reducen la dependencia del pretratamiento de materiales celulósicos pueden tener un impacto dramático en la economía del uso de la biomasa recalcitrante para la producción de biocombustibles. Un desafío en la conversión de la biomasa en productos de fermentación es la recalcitrancia y heterogeneidad del material biológico.

Los presentes inventores han encontrado microorganismos del género *Caldicellulosiruptor* que tienen una variedad de propiedades ventajosas para su uso en la conversión de material de biomasa lignocelulósica en biocombustible y/o productos químicos a base de carbono, preferiblemente en ácido láctico, preferiblemente en un proceso de una sola etapa como parte de un sistema consolidado de bioprocesamiento (CBP).

En particular, estos microorganismos son extremadamente termófilos y muestran una amplia especificidad de sustrato y alta producción natural de etanol y ácido láctico. Además, la fermentación con etanol y ácido láctico a altas temperaturas, por ejemplo, a más de 70 °C, tiene muchas ventajas frente a la fermentación mesófila. Una ventaja de la fermentación termófila es la minimización del problema de contaminación en cultivos discontinuos, cultivos discontinuos alimentados o cultivos continuos, ya que solo unos cuantos microorganismos son capaces de crecer a dichas altas temperaturas en material de biomasa de lignocelulosa no destoxificada.

También es ventajoso que las células, las cepas y los microorganismos según la presente descripción crezcan sobre material de biomasa lignocelulósica previamente tratada así como sobre material de biomasa lignocelulósica no tratada.

Las células aisladas, las cepas, los microorganismos, las composiciones y los cultivos microbianos son capaces de crecer y producir productos de fermentación a concentraciones muy elevadas de materia seca de material de biomasa lignocelulósica.

En el presente contexto, la expresión "material de biomasa lignocelulósica" pretende designar una biomasa lignocelulósica no tratada y/o una biomasa lignocelulósica que ha sido sometida a una etapa de pretratamiento mediante la que el material lignocelulósico ha sido al menos parcialmente separado en celulosa, hemicelulosa y lignina, teniendo así un aumento del área superficial y/o de la accesibilidad del material. El material lignocelulósico puede derivarse normalmente de material vegetal, tal como paja, heno, pasto perenne, desechos de jardinería, madera triturada, pieles de frutas y cáscaras de semillas.

El método de pretratamiento más usado es el pretratamiento con vapor, un proceso que comprende calentar el material lignocelulósico por inyección de vapor hasta una temperatura de 130 a 230 °C con o sin la posterior liberación repentina de la presión. Antes o durante el pretratamiento con vapor, se puede añadir opcionalmente un catalizador tal como un ácido mineral u orgánico, o un agente cáustico que facilite la desintegración de la estructura de la biomasa. Los catalizadores usados frecuentemente para dicho pretratamiento incluyen, pero no se limitan a, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido láctico, hidróxido de sodio (sosa cáustica), hidróxido de potasio, hidróxido de calcio (cal), amoníaco o las respectivas sales o anhídridos de cualquiera de estos agentes.

Dicha etapa de pretratamiento con vapor puede o no estar precedida por otra etapa de tratamiento que incluye cocinar la biomasa en agua o vaporizar la biomasa a temperaturas de 100 a 200 °C con o sin la adición de un catalizador adecuado como un ácido mineral u orgánico o un agente cáustico que facilite la desintegración de la estructura de la biomasa. Entre la etapa de cocción y la etapa subsiguiente de pretratamiento con vapor se pueden introducir una o más etapas de separación de líquido-sólido y lavado para eliminar los componentes de biomasa solubilizados con el fin de reducir o prevenir la formación de inhibidores durante la etapa subsiguiente de pretratamiento con vapor. Los inhibidores formados durante el pretratamiento por calor o vapor incluyen, pero no se limitan a, furfural formado a partir de azúcares de pentosa monoméricos, hidroximetilfurfural formado a partir de

azúcares de hexosa monoméricos, ácido acético, ácido levulínico, fenoles y derivados de fenol.

Otro tipo de hidrólisis de lignocelulosa es la hidrólisis ácida, en donde el material lignocelulósico se somete a un ácido tal como ácido sulfúrico o ácido sulfuroso mediante lo que los polímeros de azúcar celulosa y hemicelulosa se hidrolizan parcial o completamente a sus monómeros de azúcar constituyentes. Un tercer método es la oxidación en húmedo, en donde el material se trata con oxígeno a 150-185 grados centígrados. A los pretratamientos le puede seguir la hidrólisis enzimática para completar la liberación de monómeros de azúcar. Esta etapa de pretratamiento da lugar a la hidrólisis de celulosa en glucosa, mientras que la hemicelulosa se transforma en las pentosas xilosa y arabinosa, y las hexosas glucosa, manosa y galactosa. La etapa de pretratamiento se puede suplementar, en ciertas realizaciones, con un tratamiento que dé lugar a una hidrólisis adicional de la celulosa y la hemicelulosa. El objetivo de dicho tratamiento de hidrólisis adicional es hidrolizar el oligosacárido y, posiblemente, las especies de polisacáridos producidas durante la hidrólisis ácida, la oxidación húmeda o el pretratamiento con vapor de origen de celulosa y/o hemicelulosa para formar azúcares fermentables (por ejemplo, glucosa, xilosa y, posiblemente, otros monosacáridos). Dichos tratamientos adicionales pueden ser tanto químicos como enzimáticos. La hidrólisis química se realiza normalmente mediante el tratamiento con un ácido, tal como el tratamiento con ácido sulfúrico acuoso o ácido clorhídrico acuoso, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 100-150 grados centígrados. La hidrólisis enzimática normalmente se realiza mediante el tratamiento con una o más enzimas carbohidrasas apropiadas tales como celulasas, glucosidasas y hemicelulasas incluyendo xilanasas.

Se ha encontrado que los microorganismos según la presente descripción pueden crecer eficientemente sobre diversos tipos de biomasa pretratada y no tratada (por ejemplo, madera incluyendo madera de álamo, abeto y algodón, diversos tipos de hierbas y residuos de hierba, incluyendo *Miscanthus*, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, tallos de maíz, mazorcas de maíz, plantas de maíz entero, sorgo dulce).

Como se emplea en la presente memoria, el crecimiento "eficiente" se refiere al crecimiento en el que las células pueden cultivarse hasta una densidad especificada en un tiempo especificado.

Los microorganismos según la presente descripción pueden crecer eficientemente sobre celulosa cristalina y hierbas perennes pretratadas con vapor, y crecer eficientemente sobre xilano. Los principales productos cultivados en sustratos de biomasa sin tratar fueron lactato, por ejemplo, cuando los microorganismos crecieron en celobiosa y/o xilano, el rendimiento del lactato es alto.

La celobiosa es un disacárido derivado de la condensación de dos moléculas de glucosa unidas en un enlace $\beta(1\rightarrow4)$. Puede hidrolizarse, dando glucosa. La celobiosa tiene ocho grupos alcohol libres (OH), un enlace éter y dos enlaces hemiacetal, que dan lugar a fuertes enlaces de hidrógeno inter- e intramoleculares. Es un tipo de hidrato de carbono de la dieta que también se encuentra en las setas.

El xilano es un término genérico usado para describir una amplia variedad de polisacáridos altamente complejos que se encuentran en las paredes celulares de las plantas y algunas algas. Los xilanos son polisacáridos hechos de unidades de xilosa.

Los microorganismos según la presente descripción también pueden crecer eficientemente en biomasa gastada - material insoluble que permanece tras el crecimiento de un cultivo hasta la fase estacionaria tardía (por ejemplo, superior a 10^8 células/ml) sobre biomasa no tratada.

Los microorganismos según la presente descripción también crecieron eficientemente sobre celobiosa, pasto de transición sin tratar, y álamo sin tratar y álamo que se habían calentado a 98 °C durante dos minutos.

Además, los microorganismos según la presente descripción crecieron eficientemente tanto en los materiales solubles como insolubles obtenidos tras el tratamiento térmico de la biomasa.

Se ha encontrado sorprendentemente que la subespecie bacteriana según la presente descripción es capaz de crecer en un medio que comprenda un material de biomasa lignocelulósica que tenga un contenido de materia seca de al menos 10 por ciento en p/p, tal como al menos 15 por ciento en p/p, incluyendo al menos el 20 por ciento en p/p, e incluso hasta por lo menos el 25 por ciento en p/p.

Los microorganismos según la invención son bacterias termófilas anaeróbicas, y son capaces de crecer a altas temperaturas, incluso a o por encima de 70 grados centígrados. El hecho de que las cepas sean capaces de operar a esta alta temperatura es de gran importancia en la conversión de las partículas lignocelulósicas en productos de fermentación. La velocidad de conversión de los hidratos de carbono en por ejemplo, ácido láctico y/o etanol es mucho mayor cuando se realiza a altas temperaturas. Por ejemplo, la productividad de etanol volumétrica de un *Bacillus* termófilo es hasta diez veces mayor que un proceso de fermentación de levadura convencional que funciona a 30 grados centígrados. Por consiguiente, se requiere una planta de producción más pequeña para una capacidad de planta dada, reduciendo así los costes de construcción de la planta. Como se mencionó anteriormente, la alta temperatura reduce el riesgo de contaminación de otros microorganismos, lo que resulta en menos tiempo de inactividad, mayor productividad de la planta y menor requerimiento energético para la esterilización de la materia prima. La alta temperatura de operación también puede facilitar la posterior recuperación de los productos de fermentación resultantes.

El material de biomasa lignocelulósica y las fracciones hidrolizadas de lignocelulosa contienen inhibidores tales como furfural, fenoles y ácidos carboxílicos, que pueden inhibir potencialmente el organismo de fermentación. Por lo tanto, es una ventaja de los microorganismos según la presente descripción que sean tolerantes a estos inhibidores.

5 Los microorganismos según la presente descripción son nuevas especies del género *Caldicellulosiruptor* o nuevas subespecies de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*.

10 Por ejemplo, el género *Caldicellulosiruptor* incluye diferentes especies de bacterias extremadamente termófilas (crecimiento a temperatura significativamente superior a 70 °C) celulolíticas y hemicelulolíticas estrictamente anaeróbicas. La primera bacteria de este género, la cepa Tp8T de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (DSM 8903) tiene una temperatura óptima de 70 °C, y se aisló de una fuente termal en Nueva Zelanda (Rainey *et al.*, 1994; Sissons *et al.* 1987). Hidroliza una variedad de hidratos de carbono poliméricos con la producción de acetato, lactato y trazas de etanol (Donnison *et al.*, 1988). El análisis filogenético demostró que constituye un nuevo linaje dentro del subfilo *Bacillus/Clostridium* de las bacterias Gram-positivas (Rainey *et al.*, 1994).

15 Según la presente descripción, los microorganismos producen etanol y/o ácido láctico y muestran varias características que los distinguen de los microorganismos usados en la actualidad: (i) alto rendimiento y baja inhibición del producto; (ii) utilización simultánea de material de biomasa lignocelulósica y/o azúcares; e (iii) crecimiento a temperaturas elevadas. Los microorganismos según la presente descripción son organismos termófilos robustos con un riesgo reducido de contaminación. Convierten eficientemente una selección extraordinariamente amplia de componentes de biomasa en productos químicos a base de carbono como el ácido láctico o el etanol.

20 Como se mencionó anteriormente, en un aspecto, la presente descripción se refiere a una célula aislada que comprende una secuencia de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7, y una combinación de cualquiera de las mismas.

25 En un aspecto, la presente descripción se refiere a una célula aislada de *Caldicellulosiruptor* sp. que tiene una secuencia de ADNr 16S al menos un 99, al menos un 99,3, al menos un 99,5, al menos un 99,7, al menos un 99,9, al menos un 99,99 por ciento idéntica a cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 1 o una combinación de las mismas.

30 Cada realización independiente de la invención es una célula aislada que es DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp. (número de acceso DSMZ 25177), una célula aislada que es DIB041C de *Caldicellulosiruptor* sp. (número de acceso DSMZ 25771), una célula aislada que es DIB087C de *Caldicellulosiruptor* sp. (número de acceso DSMZ 25772), una célula aislada que es DIB101C de *Caldicellulosiruptor* sp. (número de acceso DSMZ 25178), una célula aislada que es DIB103C de *Caldicellulosiruptor* sp. (número de acceso DSMZ 25773), una célula aislada que es DIB104C de *Caldicellulosiruptor* sp. (número de acceso DSMZ 25774), una célula aislada que es DIB107C de *Caldicellulosiruptor* sp. (número de acceso DSMZ 25775), células derivadas de cualquiera, mutantes o un homólogo de cualquiera.

35 Como se emplea en la presente memoria, "mutante" u "homólogo" significa un microorganismo derivado de las células o cepas según la presente descripción, que se alteran debido a una mutación. Una mutación es un cambio producido en el ADN celular, que puede ser espontáneo, causado por un factor ambiental o errores en la replicación del ADN, o inducido por condiciones físicas o químicas. Los procesos de mutación incluidos en esta subclase y en subclases indentadas son procesos dirigidos a la producción de cambios esencialmente aleatorios en el ADN del microorganismo incluyendo la incorporación de ADN exógeno. Todos los mutantes de los microorganismos comprenden las ventajas de ser termófilos extremos (crecimiento y fermentación a temperaturas superiores a 70 °C) y son capaces de fermentar la biomasa lignocelulósica a etanol y/o ácido láctico. En una realización ventajosa, los mutantes de los microorganismos según la presente descripción tienen en un ensayo de hibridación de ADN-ADN, una relación de ADN-ADN de al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 98 %, lo más preferiblemente al menos un 99 % y lo más preferiblemente al menos un 99,9 % con una de las cepas bacterianas aisladas de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C, DIB041C, DIB087C, DIB101C, DIB103C, DIB104C y DIB107C.

50 La invención se basa en las cepas bacterianas aisladas *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C, DIB041C, DIB087C, DIB101C, DIB103C, DIB104C y DIB107C que contienen secuencias de ADNr 16S al menos del 99 al 100 %, preferiblemente del 99,5 al 99,99 %, más preferiblemente al menos un 99,99 por ciento idénticas a las secuencias respectivas enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1

Género	Especie	Nombre	Número de acceso DSMZ	Fecha de deposición	SEQ ID NO de ADNr 16S
<i>Caldicellulosiruptor</i>	sp.	DIB004C	DSM 25177	15 de sep. de 2011	1
<i>Caldicellulosiruptor</i>	sp.	DIB041C	DSM 25771	15 de marzo de 2012	2
<i>Caldicellulosiruptor</i>	sp.	DIB087C	DSM25772	15 de marzo de 2012	3
<i>Caldicellulosiruptor</i>	sp.	DIB101C	DSM 25178	15 de sep. de 2011	4
<i>Caldicellulosiruptor</i>	sp.	DIB103C	DSM 25773	15 de marzo de 2012	5
<i>Caldicellulosiruptor</i>	sp.	DIB104C	DSM 25774	15 de marzo de 2012	6
<i>Caldicellulosiruptor</i>	sp.	DIB107C	DSM 25775	15 de marzo de 2012	7

Las cepas enumeradas en la Tabla 1 se han depositado de conformidad con lo dispuesto en el Tratado de Budapest del 15 de septiembre de 2011 con DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, en virtud de los números de acceso DSMZ indicados respectivamente y de las fechas de deposición, respectivamente, por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE).

Los microorganismos de la especie *Caldicellulosiruptor* sp. según la presente descripción se refieren en particular a un microorganismo que pertenece al género *Caldicellulosiruptor* y que tiene preferiblemente una o más de las siguientes características:

- 5 a) es un microorganismo del género *Caldicellulosiruptor*;
- b) en un ensayo de hibridación de ADN-ADN, muestra una relación de ADN-ADN de al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 98 %, lo más preferiblemente al menos un 99 % con cualquier cepa de *Caldicellulosiruptor* sp. de la Tabla 1 con sus respectivos números de acceso; y/o
- 15 c) muestra un nivel de similitud de secuencia del gen de ADNr 16S de al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 % o al menos un 99,5 %, más preferiblemente un 100 % con cualquier cepa de *Caldicellulosiruptor* sp. enumerada en la Tabla 1 con sus respectivos números de acceso; y/o
- d) es capaz de sobrevivir en condiciones de altas temperaturas superiores a 75°C;
- e) es capaz de sobrevivir en condiciones de altas temperaturas superiores a 70°C; y/o
- 20 f) es una bacteria Gram-positiva.

Preferiblemente, se cumplen al menos dos o al menos tres, y más preferiblemente todos los criterios definidos anteriormente a) a f)

En una realización ventajosa, los microorganismos según la presente descripción se refieren, en particular, a un microorganismo que pertenece al género *Caldicellulosiruptor* y que tiene preferiblemente una o más de las siguientes características:

- a) es un microorganismo del género *Caldicellulosiruptor*;
- b) es un microorganismo de la especie *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*;
- 30 c) en un ensayo de hibridación de ADN-ADN, muestra una relación de ADN-ADN de al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 98 %, lo más preferiblemente al menos un 99 % y lo más preferiblemente al menos un 99,9 % con cualquier una de las cepas de la Tabla 1; y/o
- d) muestra un nivel de similitud de secuencia del gen de ADNr 16S de al menos un 98 %, preferiblemente al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o al menos un 99,7 %, más preferiblemente un 99,99 % con una de las cepas enumeradas en la Tabla 1; y/o
- 35 e) es capaz de sobrevivir y/o cultivar y/o producir un producto de fermentación seleccionado del grupo que consiste en ácidos y alcoholes en condiciones de temperatura superiores a 70 °C, en particular, superiores a 72 °C.

Preferiblemente, se cumplen al menos dos o al menos tres, y más preferiblemente todos los criterios definidos anteriormente a) a e).

5 La expresión "relación de ADN-ADN", en particular, se refiere al porcentaje de similitud del ADN genómico o entero de dos microorganismos medido mediante el ensayo de hibridación/renaturalización de ADN-ADN según De Ley *et al.* (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 133-142 o Huß *et al.* (1983) *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 184-192. En particular, el ensayo de hibridación de ADN-ADN es realizado preferiblemente por el Servicio de Identificación DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania).

10 La expresión "similitud de la secuencia de gen de ADNr 16S" se refiere, en particular, al porcentaje de nucleótidos idénticos entre una región de la secuencia de ácido nucleico del gen de ARN ribosomal (ADNr) 16S de un primer microorganismo y la región correspondiente de la secuencia de ácido nucleico de la secuencia del gen de ADNr 16S de un segundo microorganismo. Preferiblemente, la región comprende al menos 100 nucleótidos consecutivos, más preferiblemente al menos 200 nucleótidos consecutivos, al menos 300 nucleótidos consecutivos o al menos 400 nucleótidos consecutivos, lo más preferiblemente aproximadamente 480 nucleótidos consecutivos.

15 Las cepas según la descripción tienen el potencial de ser capaces de producir una serie de diferentes productos de fermentación, incluyendo ácidos, alcoholes, cetonas e hidrógeno. En una realización, el alcohol se selecciona entre etanol, butanol, propanol, metanol, propanodiol y butanodiol. En una realización adicional, el ácido es ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico, ácido butírico o ácido fórmico, y la cetona es acetona.

20 Las cepas de *Caldicellulosiruptor* sp. según la presente descripción tienen varias características muy ventajosas necesarias para la conversión del material de biomasa lignocelulósica. Así pues, estas cepas de base poseen toda la maquinaria genética para la hidrólisis de celulosa y hemicelulosas, y para la conversión de ambos azúcares de pentosa y hexosa en diversos productos de fermentación tales como ácido láctico y etanol. Como resultará evidente a partir de los siguientes ejemplos, el examen de la secuencia completa del ADNr 16S mostró que las cepas estrechamente relacionadas pueden estar relacionadas con *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, aunque las secuencias de ADNr 16S pueden situarlas en una subespecie separada o incluso una especie diferente.

25 Además, las cepas de *Caldicellulosiruptor* sp. según la presente descripción son celulolíticas y xilanolíticas.

En una realización preferida, el microorganismo de *Caldicellulosiruptor* sp. es:

30 a) DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp., depositada el 15 de septiembre de 2011 con el número de acceso DSM 25177 según los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE);

b) un microorganismo derivado de DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp. o

c) una DIB004C mutante de *Caldicellulosiruptor* sp.

En otra realización preferida, el microorganismo de *Caldicellulosiruptor* sp. es:

35 a) DIB041C de *Caldicellulosiruptor* sp., depositada el 15 de marzo de 2012 con el número de acceso DSM 25771 según los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE);

b) un microorganismo derivado de DIB041C de *Caldicellulosiruptor* sp. o

c) una DIB041C mutante de *Caldicellulosiruptor* sp.

40 En otra realización preferida, el microorganismo de *Caldicellulosiruptor* sp. es:

a) DIB087C de *Caldicellulosiruptor* sp., depositada el 15 de marzo de 2012 con el número de acceso DSM 25772 según los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE);

45 b) un microorganismo derivado de DIB087C de *Caldicellulosiruptor* sp. o

c) una DIB087C mutante de *Caldicellulosiruptor* sp.

En otra realización preferida, el microorganismo de *Caldicellulosiruptor* sp. es:

50 a) DIB101C de *Caldicellulosiruptor* sp., depositada el 15 de septiembre de 2011 con el número de acceso DSM 25178 según los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH,

Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE);

b) un microorganismo derivado de DIB101C de *Caldicellulosiruptor sp.* o

c) una DIB101C mutante de *Caldicellulosiruptor sp.*

En otra realización preferida, el microorganismo de *Caldicellulosiruptor sp.* es:

5 a) DIB103C de *Caldicellulosiruptor sp.*, depositada el 15 de marzo de 2012 con el número de acceso DSM 25773 según los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE);

b) un microorganismo derivado de DIB103C de *Caldicellulosiruptor sp.* o

10 c) una DIB103C mutante de *Caldicellulosiruptor sp.*

En otra realización preferida, el microorganismo de *Caldicellulosiruptor sp.* es:

15 a) DIB104C de *Caldicellulosiruptor sp.*, depositada el 15 de marzo de 2012 con el número de acceso DSM 25774 según los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE);

b) un microorganismo derivado de DIB104C de *Caldicellulosiruptor sp.* o

c) una DIB104C mutante de *Caldicellulosiruptor sp.*

En otra realización preferida, el microorganismo de *Caldicellulosiruptor sp.* es:

20 a) DIB107C de *Caldicellulosiruptor sp.*, depositada el 15 de marzo de 2012 con el número de acceso DSM 25775 según los requisitos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE);

b) un microorganismo derivado de DIB107C de *Caldicellulosiruptor sp.* o

c) una DIB107C mutante de *Caldicellulosiruptor sp.*

25 Todas las cepas enumeradas anteriormente y en la Tabla 1 pertenecen al género *Caldicellulosiruptor* y son bacterias gram-positivas estrictamente anaeróbicas, no esporíferas, no móviles. Las células son varillas rectas de 0,4 a 0,5 µm por 2,0 a 4,0 µm, que se dan tanto individualmente como en parejas. Después de 7 días de incubación a 72 °C en medio sólido con agar y celulosa como sustrato, ambas cepas forman colonias lechosas circulares de 0,5 a 1 mm de diámetro. Se producen zonas de clareo alrededor de las colonias que indican la degradación de la celulosa.

30 La expresión "un microorganismo", como se emplea en la presente memoria, puede referirse solo a un organismo unicelular, así como a numerosos organismos unicelulares individuales. Por ejemplo, la expresión "un microorganismo del género *Caldicellulosiruptor*" puede referirse a una sola célula bacteriana de *Caldicellulosiruptor* del género *Caldicellulosiruptor*, así como a múltiples células bacterianas del género *Caldicellulosiruptor*.

35 En la presente memoria, las expresiones "una cepa del género *Caldicellulosiruptor*" y "una célula de *Caldicellulosiruptor*" se usan como sinónimos. En general, la expresión "un microorganismo" se refiere a numerosas células. En particular, dicho término se refiere a al menos 10³ células, preferiblemente al menos 10⁴ células, al menos 10⁵ o al menos 10⁶ células.

40 Como se mencionó anteriormente, la biomasa lignocelulítica según la presente descripción puede ser, pero no se limita a, pasto, pasto de transición, gramíneas, ballico, alpiste arundináceo, pasto mixto de pradera, *Miscanthus*, pasto Napier, residuos de azúcar, bagazo de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, residuos agrícolas, paja de arroz, cáscaras de arroz, paja de cebada, mazorcas de maíz, paja de cereal, paja de trigo, paja de colza, paja de paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, hojarasca, hojarasca de soja, hojarasca de maíz, desechos forestales, fibra de pulpa de madera reciclada, lodos de papel, aserrín, madera dura, madera blanda, prensado de remolacha azucarera, tallo de algodón, hojas de plátano, residuos de palma aceitera y material de biomasa lignocelulósica obtenido mediante el procesamiento de plantas alimentarias. En realizaciones ventajosas, el material de biomasa lignocelulósica es madera dura y/o madera blanda, preferiblemente madera de álamo. En realizaciones ventajosas, el material de biomasa lignocelulósica es una hierba o pasto perenne, preferiblemente *Miscanthus*.

45 En realizaciones ventajosas, el material de biomasa lignocelulósica se somete a pretratamiento mecánico, termoquímico y/o bioquímico. El material de biomasa lignocelulósica podría exponerse al tratamiento con vapor. En realizaciones adicionales, el material de biomasa lignocelulósica es tratado previamente con trituración mecánica y

50

un tratamiento subsiguiente con ácido láctico, ácido acético, ácido sulfúrico o ácido sulfuroso, o sus respectivas sales o anhídridos bajo calor y presión con o sin una liberación repentina de presión. En otra realización, el material de biomasa lignocelulósica es tratado previamente con trituración mecánica y un tratamiento subsiguiente con hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio o hidróxido de potasio con calor y presión con o sin una liberación repentina de la presión.

En realizaciones ventajosas, el material de biomasa lignocelulósica es tratado previamente con trituración mecánica y la posterior exposición a un proceso de pretratamiento combinado de varias etapas. Dicho pretratamiento combinado de múltiples etapas puede incluir una etapa de tratamiento que consiste en cocinar en agua o vaporizar el material de biomasa lignocelulósica a una temperatura de 100 a 200 °C durante un período de tiempo de entre 5 y 120 min. Los catalizadores adecuados que incluyen, pero no se limitan a, ácido láctico, ácido acético, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio o hidróxido de potasio, o sus respectivas sales o anhídridos pueden o no añadirse al proceso. El proceso puede incluir además una etapa que comprenda una operación de separación líquido-sólido, p. ej., filtración, separación, centrifugación o una combinación de las mismas, separando el fluido del proceso que contiene constituyentes parcial o totalmente hidrolizados y solubilizados del material de biomasa lignocelulósica de las partes insolubles restantes de la biomasa lignocelulósica. El proceso puede incluir además una etapa que comprende el lavado del material de biomasa lignocelulósica restante. El material sólido separado de los constituyentes de biomasa solubilizados puede tratarse entonces en una segunda etapa con vapor de agua bajo calor y presión con o sin una liberación repentina de la presión a una temperatura de 150 a 250 °C durante un período de tiempo de entre 1 y 15 min. Para aumentar la eficacia del pretratamiento, también se puede añadir a la segunda etapa un catalizador adecuado incluyendo, pero sin limitarse a, ácido láctico, ácido acético, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio o hidróxido de potasio, o sus respectivas sales o anhídridos.

En realizaciones ventajosas, la biomasa lignocelulósica se tritura antes de convertirse en biocombustibles como etanol y/o sustancias químicas a base de carbono, tales como el ácido láctico. En una realización, la biomasa lignocelulósica es biomasa pretratada de *Populus* sp., preferiblemente pretratada con un pretratamiento con vapor o pretratamiento combinado de múltiples etapas. En otra realización, la biomasa lignocelulósica es biomasa pretratada de cualquier pasto perenne, p. ej., *Miscanthus* sp., preferiblemente tratado con un pretratamiento de vapor o pretratamiento combinado de múltiples etapas.

En realizaciones ventajosas, las células, las cepas, los microorganismos se pueden modificar para obtenerse mutantes o derivados con mejores características. Así pues, en una realización, se proporciona una cepa bacteriana según la descripción, en donde uno o más genes se han insertado, eliminado o inactivado esencialmente. La variante o mutante normalmente es capaz de crecer en un medio que comprenda un material de biomasa lignocelulósica.

En otra realización, se proporciona un proceso de preparación de variantes o mutantes de los microorganismos según la presente descripción, en donde uno o más genes se insertan, se suprimen o se inactivan esencialmente como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se insertan uno o más genes adicionales en las cepas según la presente descripción. Por lo tanto, para mejorar el rendimiento del producto de fermentación específico, puede ser beneficioso insertar uno o más genes que codifiquen una polisacarasa en la cepa según la invención. Por consiguiente, en realizaciones específicas, se proporciona una cepa y un proceso según la invención en donde se insertan uno o más genes que codifican una polisacarasa que se selecciona de celulasas (tales como EC 3.2.1.4); beta-glucanasas, incluyendo glucano-1,3-beta-glucosidasas (exo-1,3-beta-glucanasas, tales como EC 3.2.1.58), 1,4-beta-celobiohidrolasas (tales como EC 3.2.1.91) y endo-1,3(4)-beta-glucanasas (tales como EC 3.2.1.6); xilanasas, incluyendo endo-1,4-beta-xilanasas (tales como EC 3.2.1.8) y xilano 1,4-beta-xilosidasas (tales como EC 3.2.1.37); pectinasas (tales como EC 3.2.1.15); alfa-glucuronidasas, alfa-L-arabinofuranosidasas (tales como EC 3.2.1.55), acetilesterasas (tales como EC 3.1.1), acetilxilanesterasas (tales como EC 3.1.1.72), alfa-amilasas (tales como EC 3.2.1.1), beta-amilasas (tales como EC 3.2.1.2), glucoamilasas (tales como EC 3.2.1.3), pululaninas (tales como EC 3.2.1.41), beta-glucanasas (tales como EC 3.2.1.73), hemicelulasas, arabinosidasas, mananasas incluyendo manano endo-1,4-beta-manosidasas (tales como EC 3.2.1.78) y manano endo-1,6-alfa-manosidasas (tales como EC 3.2.1.101), pectina hidrolasas, poligalacturonasas (tales como EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasas (tales como EC 3.2.1.67) y pectato liasas (tales como EC 4.2.2.10).

Según la presente descripción, también se proporciona un método de producción de un producto de fermentación que comprende el cultivo de una cepa según la invención en condiciones adecuadas.

Las cepas según la descripción son microorganismos estrictamente anaeróbicos y, por lo tanto, se prefiere que el producto de fermentación se produzca mediante un proceso de fermentación realizado en condiciones estrictamente anaeróbicas. Además, la cepa según la invención es un microorganismo extremadamente termófilo y, por lo tanto, el proceso puede funcionar óptimamente, cuando se hace funcionar a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 40 a 95 grados centígrados, tal como el intervalo de aproximadamente 50 a 90 grados centígrados, incluyendo el intervalo de aproximadamente 60 a 85 grados centígrados, tal como el intervalo de aproximadamente 65 a 75 grados centígrados.

5 Para la producción de ciertos productos de fermentación, puede ser útil seleccionar un proceso de fermentación específico, tal como un proceso de fermentación discontinua, que incluye un proceso alimentado por lotes o un proceso de fermentación continua. Además, puede ser útil seleccionar un reactor de fermentación tal como un reactor de recipiente agitado, un reactor de celda inmovilizada, un reactor de lecho fluidizado o un biorreactor de membrana.

Según la invención, el método es útil para la producción de una amplia selección de productos de fermentación que incluyen ácidos, alcoholes, cetonas e hidrógeno. Por lo tanto, se pueden producir productos de fermentación tales como etanol, butanol, propanol, metanol, propanodiol, butanodiol, ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico, ácido butírico, ácido fórmico y acetona según la descripción.

10 La expresión "comprender", como se emplea en la presente memoria, además de su significado literal, también incluye y se refiere específicamente a las expresiones "consisten esencialmente en" y "consisten en". Por lo tanto, la expresión "comprender" se refiere a realizaciones en donde la materia objeto que "comprende" elementos enumerados específicamente no comprende elementos adicionales, así como las realizaciones en donde la materia objeto que "comprende" elementos enumerados específicamente puede englobar y/o de hecho sí engloba otros elementos. Asimismo, el término "tener" se ha de entender como el término "comprender", incluyendo también y refiriéndose específicamente a las expresiones "consisten esencialmente en" y "consisten en".

Los siguientes métodos y ejemplos solo se ofrecen con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción de ninguna manera.

Métodos y ejemplos

20 En los siguientes ejemplos, se proporcionan materiales y métodos de la presente descripción que incluyen la determinación de las propiedades de las cepas microbianas según la presente descripción. Debe entenderse que estos ejemplos tienen un fin meramente ilustrativo y, de ningún modo, deben interpretarse como limitantes de la presente descripción.

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo

25 Todos los procedimientos de enriquecimiento y aislamiento de las cepas enumeradas en la Tabla 1 emplearon técnicas anaeróbicas para bacterias estrictamente anaeróbicas (Hungate, 1969). Las cepas se enriquecieron a partir de muestras ambientales a temperaturas superiores a 70 °C con celulosa cristalina y madera de haya como sustrato. El aislamiento se realizó recolectando colonias cultivadas en medio de agar sólido a 72 °C en tubos de rodillo Hungate (Hungate, 1969).

30 Las células se cultivan en condiciones estrictamente anaeróbicas aplicando el siguiente medio:

Medio básico		
NH ₄ Cl	1,0	g
NaCl	0,5	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05	g
NaHCO ₃	0,5	g
K ₂ HPO ₄	1,5	g
KH ₂ PO ₄	3,0	g
Extracto de levadura (bacto, BD)	0,5	g
Celobiosa	5,0	g
Vitaminas (véase más abajo)	1,0	ml
Elementos traza (véase más abajo)	0,5	ml
Resazurina	1,0	mg
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,75	g

ES 2 638 910 T3

Agua destilada	1000,0	ml
Solución madre de elementos traza		
NiCl ₂ x 6H ₂ O	2	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	1	g
Citrato de NH ₄ Fe (III), marrón, Fe al 21,5 %	10	g
MnSO ₄ x H ₂ O	5	g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	1	g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1	g
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,1	g
H ₃ BO ₃	0,1	g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,1	g
Na ₂ SeO ₃ x 5H ₂ O	0,2	g
Na ₂ WO ₄ x 2H ₂ O	0,1	g
Agua destilada	1000,0	ml
Se añaden 0,5 ml de solución madre de elementos traza a 1 litro del medio		
Solución madre de vitaminas		
Ácido nicotínico	200	mg
Cianocobalamina	25	mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico (ácido 4-aminobenzoico)	25	mg
D-pantotenato de calcio	25	mg
HCl de tiamina	25	mg
Riboflavina	25	mg
Ácido lipoico	25	mg
Ácido fólico	10	mg
Biotina	10	mg
HCl de piridoxina	10	mg
Agua destilada	200,0	ml
Se añade 1 ml de solución madre de vitaminas a 1 litro del medio		

5 Todos los ingredientes excepto el sulfuro se disuelven en agua desionizada y se lava abundantemente el medio con gas de nitrógeno (pureza del 99,999 %) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la adición del sulfuro, se ajusta el valor del pH a 7,0 a temperatura ambiente con HCl 1 M. A continuación, se dispensa el medio en tubos de Hungate o matraces de suero bajo atmósfera de nitrógeno, y los recipientes se sellan herméticamente. Tras esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min, el valor de pH debe estar entre 6,8 y 7,0.

Las fuentes de carbono especificadas para experimentos individuales se añaden antes de la esterilización por autoclave. Todas las concentraciones de sustrato aplicadas se indican como equivalentes de glucosa sobre la base

de moles de C disponibles (carbono).

Tras la esterilización por autoclave, se inoculan los cultivos mediante la inyección de un cultivo de siembra a través del septo de sellado y se inoculan en una incubadora a 72 °C durante el tiempo indicado.

Ejemplo 2: HPLC

- 5 Se cuantificaron los azúcares y los productos de fermentación por HPLC-RI, usando un Via Hitachi LaChrom Elite (Hitachi corp.) dotado de una columna de ácido orgánico ROA H⁺ de Rezex (Phenomenex). Los analitos se separaron isocráticamente con H₂SO₄ 2,5 mM y a 65 °C.

Ejemplo 3: Análisis filogenético de genes de ADNr 16S

- 10 Se aisló ADN genómico de cultivos desarrollados como se describió anteriormente y se amplificó ADNr 16S mediante PCR usando 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; SEQ ID NO: 8) como cebador directo y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT; SEQ ID NO: 9) como cebador inverso. Se secuenciaron los productos resultantes y se analizaron las secuencias usando el software Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation). Se usó la base de datos NCBI para los procedimientos BLAST.

- 15 La secuenciación de ADNr 16S de todas las cepas enumeradas en la Tabla 1 reveló que todas ellas tenían (al menos) una copia de un operón de ADNr 16S que estaba más estrechamente relacionado con *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Cepa Tp8T = DSM8903) en las bases de datos públicas disponibles. La alineación se llevó a cabo usando ClustalW (Chenna *et al.*, 2003) y el árbol filogenético se construyó usando el software MEGA4 (Kumar *et al.*, 2001). El árbol para todas las cepas enumeradas en la Tabla 1 se muestra en la Figura 1.

- 20 Las secuencias de ADNr 16S de todas las cepas enumeradas en la Tabla 1 tienen un 99 % de porcentaje de identidad con la secuencia respectiva de p. ej., *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Cepa Tp8T = DSM8903).

Ejemplo 4: Experimentos en lotes

Los experimentos en lotes con todas las cepas se realizaron mediante cultivo en el medio descrito anteriormente con los sustratos de fuente de carbono enumerados en las Figuras 10 y 11. Se usaron tubos de Hungate sellados o matraces de suero para el cultivo en una incubadora convencional a una temperatura de 72 °C.

- 25 Los resultados muestran claramente que todas las cepas son capaces de producir etanol y ácido láctico sobre azúcares solubles, sobre polímeros de azúcar solubles e insolubles, así como sobre la lignocelulosa pretratada en ausencia de azúcares libres.

- 30 La comparación fisiológica con la cepa DSM8903 identificada como la relacionada más estrechamente con la comparación de ADNr 16S indica una formación significativamente mayor de etanol y lactato en combinación con una producción parcialmente reducida de acetato sobre sustratos poliméricos.

Ejemplo 5: Fermentación

- 35 Se realizaron experimentos en lotes con todas las cepas, p. ej., DIB004C, mediante el cultivo en el medio descrito anteriormente con la adición de pasto de *Miscanthus* a 20 g/l pretratado con un método adecuado seleccionado entre los descritos anteriormente, que comprende calentar en presencia de ácido diluido seguido de la liberación repentina de presión.

La temperatura se controla a 72 °C y el valor de pH se controla a 6,75 ± 0,1 durante toda la fermentación. El fermentador se purga con nitrógeno para eliminar el exceso de oxígeno antes de añadir sulfuro de sodio como se describió anteriormente.

La fermentación se inicia mediante la adición de un cultivo de siembra preparado como se describe en el Ejemplo 1.

- 40 Los resultados del análisis de HPLC descritos en el Ejemplo 2 muestran la producción paralela de etanol, ácido láctico y ácido acético.

Los resultados de la formación del producto durante la fermentación de DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp. en pasto de *Miscanthus* pretratado se muestran en la Figura 9.

Listado de referencias adicionales

- Rainey F. A., Donnison A. M., Janssen P. H., Saul D., Rodrigo A., Bergquist P. L., Daniel R. M., Stackebrandt E., Morgan H. W.. (1994) "Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium". *FEMS Microbiol Lett.* 120:263-266.
- 5 Sissons C. H., Sharrock K. R., Daniel R. M., Morgan H. W.. (1987) "Isolation of cellulolytic anaerobic extreme thermophiles from New Zealand thermal sites". *Appl Environ Microbiol.* 53:832-838.
- Donnison A. M., Brockelsby C. M., Morgan H. W., Daniel R. M. (1989) "The degradation of lignocellulosics by extremely thermophilic microorganisms". *Biotechnol Bioeng.* 33:1495-1499.
- 10 Hungate R. E. (1969) "A roll tube method for cultivation of strict anaerobes". En: *Methods in Microbiology*, Eds. Norris J. R. y Ribbons D. W. pág. 118-132. Nueva York: Academic Press.
- Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T. J., Higgins D. G., Thompson J. D. (2003) "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs". *Nucleic Acids Res.* 13:3497-3500.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I. B., Nei M. (2001) "MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software". *Bioinformatics.* 17:1244-1245.

15 **Listado de secuencias**

- <110> DIREVO Industriell Biotechnology GmbH
- 20 <120> BIOCONVERSIÓN DE UNA SOLA ETAPA DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA CON BACTERIAS
 TERMÓFILAS EXTREMAS
- <130> DIR-PA12-PCT
- 25 <150> USUS 61/537.892
 <151> 22-09-2011
- <150> EPEP 11007706
 <151> 22-09-2011
- 30 <150> USUS 61/669.981
 <151> 10-07-2012
- <150> EPEP 12175679
 <151> 10-07-2012
- 35 <160> 9
- 1<170> BiSSAP 1.2
- 40 <210> 1
 <211> 1396
 <212> ADN
 <213> *Caldicellulosiruptor*
- 45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1396
 <223> /organismo="Caldicellulosiruptor"
 /observación="ADNr 16S"
- 50 /tipo_mol="ADN sin asignar"
- <400> 1

ES 2 638 910 T3

ttacgacttc accccaatca tcagcccac cttcaacaca gcttaacctg tgtcttcagg 60
 tgttgctgac tctcatggtg tgacgggogg tgtgtacaag gccogggaac gtattcacog 120
 cggcatgctg atccgcgatt actagcgatt ccgacttcat gcaggcgagt tgcagcctgc 180
 aatccgaact gggggtgctt ttttgggatt cgtccggct cgcgccttcg cacgccctct 240
 gtagcacca ttgtagcacg tgtgtagccc agggcataag gggcatgatg atttgacgtc 300
 atccccacct tctccgcct catcgacggc agtcccetta gagtgccac cattacgcgc 360
 tggcaactaa gggcaggggt tgcgctcgtt gcgggactta acccaacatc tcacgacacg 420
 agctgacgac aacctgacac cacctgtgtc cgggctcctg ctctcatcga acaggcacc 480
 caccctttcg ggcaggtccc cggcatgtca agccctggta aggttcttcg cgttgcttcg 540
 aattaaacca catgctccac cgcttgtgog ggcocccgtc aattcctttg agtttcaacc 600
 ttggggcct actccccagg cgggatgctt attgtgttaa ctacggcacg gaggagtctt 660
 tctccccac acctagcatc catcgtttac agcgtggact accaggtat ctaatcctgt 720
 tcgctccca cgtttcgtg cctcagcgtc agttaaggtc cagacggccg ccttcgccac 780
 tgggtgttct cccgatatct acgcatttca ccgctacacc ggaattccg ccgtcctctc 840
 ccgcaactca gctatgcagt attaagcga atccttaggt tgagcctaag gctttcacgc 900
 ttaactcgca tagccgcta cgcacccttt acgccagta attccggaca acgctcgcca 960
 cctacgtatt accogggctg ctggcacgta gttagcogtg gctttttaa cgggtactat 1020
 ctctacttc tccccgtcca aagaggttta cccccgaag ggcttcttc ctcacggggc 1080
 gtcgctgct caggcttccg cccattgcgc aagattccc gctgctgct ccogtaggag 1140
 tgtgggcct gtctcagtc cactgtggcc gtacaccctc tcaggccggc taccgctcgt 1200
 cgccttggta ggcggttacc ccaccaacta gctgatgggc cgcgagccca tcccagcca 1260
 gtatagcctc cccggctacc cttcaccac atcaccatgc gatgacgtgg tccatcggg 1320
 tattagcagc ccttcgagc tgttatcccc gtgctggggg taggttgctc acgtgttact 1380
 caccgctccg ccgcta 1396

- 5 <210> 2
- <211> 1480
- <212> ADN
- <213> *Caldicellulosiruptor*
- 10 <220>
- <221> fuente
- <222> 1..1480
- <223> /organismo="Caldicellulosiruptor"
- /observación="ADNr 16S"
- /tipo_mol"ADN sin asignar"
- 15 <400> 2

ES 2 638 910 T3

ctcaggacga acgctggcgg cgtgcctaac gcatgcaagt cgagcggagg tagccatgaa 60
 ggtgaagagc tggagtggct atcttagcgg cggacgggtg agtaacacgt gagcaaccta 120
 ccctcagcac ggggataaca gctcgaaagg gctgctaata cccgatggga ccacggcatc 180
 gcatgatggt gtggtgaaag ggtagccgtg gaggctatac cggctgggga tgggctcgcg 240
 gcccatcagc tagttggtgg ggtaacggcc taccaaggct acgacgggta gccggcctga 300
 gagggtggtc ggccacagtg ggactgagac acggccaca ctctacggg aggcagcagc 360
 ggggaatctt gcgcaatggg cgaaagcctg acgcagcagc gccgcgtgag ggaggaagcc 420
 cttcggggtg taaacctctt tggacgggga gaaggaggag atagtaccg tttaaaaagc 480
 cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcgagcgt tgtccggaat 540
 tactgggcgt aaagggtgcg tagggcgcta tgcaagttaa gcgtgaaatc ttggggctca 600
 accccaaggc tgcgcttaat actgcatagc ttgagtgcgg gagaggacgg cggaattccc 660
 ggtgtagcgg tgaatgcgt agatatcggg aggaacacca gtggcgaagg cggccgtctg 720
 gaccgtaact gacgctgagg cacgaaagcg tggggagcga acaggattag atacctggt 780
 agtccacgct gtaaacgatg gatgctaggt gtgggggaga aggactcctc cgtgccgtag 840
 ttaacacaat aagcatcccg cctggggagt acggccgcaa gttgaaact caaaggaatt 900
 gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct 960
 taccagggct tgacatgccg ggaacctgcc cgaaagggtg gggcgcctgc gcgatgagtg 1020
 caggagcccc gacacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt 1080
 taagtcccgc aacgagcgc aacctgcc ttagttgcca gcacgtaatg gtgggcactc 1140
 taaggggact gccgcgatg aggcggagga aggtgggat gacgtcaaat catcatgcc 1200
 cttatgccct gggctacaca cgtgctaaa tgggtgctac agagggttgc gaaggcgcga 1260
 gccggagcta atccccaaaa agcaccacca gttcggattg caggctgcaa ctgcctgca 1320
 tgaagtcgga atcgctagta atcgcgatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc 1380
 ttgtacacac cgcctgcac accatgagag tcagcaacac ctgaagacac agggcagctg 1440
 tgttgaaggt ggggctgatg attggggtga agtcgtaaca 1480

5 <210> 3
 <211> 1481
 <212> ADN
 <213> *Caldicellulosiruptor*

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1481
 <223> /organismo="Caldicellulosiruptor"
 /observación="ADNr 16S"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"

15 <400> 3

ES 2 638 910 T3

tcaggacgaa cgctggcggc gtgcctaacg catgcaagtc gagcggagat ggtggttгаа 60
 ggtgatgagc tggaggtgc catcttagcg gcgacgggt gagtaacacg tgagcaacct 120
 acccccagca cggggataac agctcgaaag ggctgctaata acccgatggg accacgtcat 180
 cgcattggtg tgtggtgaaa gggtagccgg ggaggctata ctggctgggg atgggctcgc 240
 ggcccatcag ctagtgtgtg gggtaacggc tcaccaaggc gacgacgggt agccggcctg 300
 agaggggtgta cggccacagt gggactgaga cacggcccac actcctacgg gaggcagcag 360
 cggggaatct tgcgcaatgg gcggaagcct gacgcagcga cgcgcgtga ggaagaagc 420
 ccttcgggggt gtaaacctct ttggacgggg agaagtagga gatagtaccg gtttaaaaag 480
 ccacggctaa ctactgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcgagcg ttgtccggaa 540
 ttactggggc taaaggtgc gtaggcggct atgcgagtta agcgtgaaag ccttaggctc 600
 aacctaagga ttgcgcttaa tactgcatag cttgagtgcg ggagaggacg gcggaattcc 660
 cgggtgtagcg gtgaaatgcg tagatatcgg gaggaacacc agtggcgaag gcgcccgtct 720
 ggaccgtaac tgacgctgag gcacgaaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg 780
 tagtccacgc tgtaaacgat ggatgctagg tgtgggggag aaggactctt ccgtgccgta 840
 gtaaacacaa taagcatccc gcctggggag tacggccgca aggttgaaac tcaaaggaat 900
 tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
 ttaccagggc ttgacatgcc ggggacctgc ccgaaagggg ggggtgcctg ttcgatgaga 1020
 gcaggaaccc ggacacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatggtggg 1080
 ttaagtcccg caacgagcgc aaccctgcc cttagtggcc agcgggtaat ggtgggcact 1140
 ctaaggggac tgccgtcgat gaggcggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc 1200
 cttatgccc tgggctacac acgtgctaca atgggtgcta cagagggcgt gcgaaggcgc 1260
 gagccggagc gaatcccaaa aaagcaccoc cagttcggat tgcaggtgc aactcgcctg 1320
 catgaagtgc gaatcgttag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg 1380
 cttgtacac accgcccgtc acaccatgag agtcagcaac acctgaagac acaggttaag 1440
 ctgtgttгаа ggtggggctg atgattgggg tgaagtcgta a 1481

5 <210> 4
 <211> 1212
 <212> ADN
 <213> *Caldicellulosiruptor*

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1212
 <223> /organismo="Caldicellulosiruptor"
 /observación="ADNr 16S"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"

15 <400> 4

ES 2 638 910 T3

cctgtgtctt caggtgttgc tgactctcat ggtgtgacgg gcggtgtgta caaggcccgg 60
 gaacgtattc accgcggcat gctgatocgc gattactagc gattccgact tcatgcaggc 120
 gagttgcagc ctgcaatccg aactgggggt gcttttttgg gattcgctcc ggctcgcgcc 180
 ttcgcacgcc ctctgtagca cccattgtag cacgtgtgta gccacgggca taaggggcat 240
 gatgatttga cgtcatcccc accttctccc gctcatcga cggcagtccc cttagagtgc 300
 ccaccattac gcgctggcaa ctaagggcag gggttgcgct cgttgcggga ctaacccaa 360
 catctcacga cacgagctga cgacaacct gaccacctg tgtccgggct cctgctctca 420
 tcgaacaggc accccacct ttccggcagg tccccggcat gtcaagccct ggtaaggttc 480
 ttcgcgttgc ttcgaattaa accacatgct ccaccgcttg tgcgggcccc cgtcaattcc 540
 tttgagtttc aaccttgcgg cgtactccc caggcgggat gcttattgtg ttaactacgg 600
 cacggaggag tccttctccc ccacacctag catccatcgt ttacagcgtg gactaccagg 660
 gtatctaate ctgttcgctc cccacgcttt cgtgcctcag cgtcagttac ggtccagacg 720
 gccgccttcg ccaactggtgt tcctcccgat atctacgcat ttcaccgcta caccgggaat 780
 tccgccgtcc tctccgcac tcaagctatg cagtattaag cgcaatcctt aggttgagcc 840
 taaggctttc acgcttaact cgcatacgcc cctacgcacc ctttacgccc agtaattccg 900
 gacaacgctc gccacctacg tattaccgcg gctgctggca cgtagttagc cgtggctttt 960
 taaacgggta ctatctccta cttctccccg tccaaagagg tttacacccc gaagggttc 1020
 ttcctcacg cggcgtcgtc ggtcaggct tcggccatt ggcgaagatt cccgctgct 1080
 gcctccgta ggagtgtggg cgtgtctca gtcccactgt ggccgtacac cctctcaggc 1140
 cggctacccg tcgtcgctt ggtaggcgt taccaccaca actagctgat gggccgagag 1200
 cccatcccc a gc 1212

5 <210> 5
 <211> 1253
 <212> ADN
 <213> *Caldicellulosiruptor*

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1253
 <223> /organismo="*Caldicellulosiruptor*"
 /observación="ADNr 16S"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"

15 <400> 5

ES 2 638 910 T3

```

cgacttoacc ccaatcatca gccccacctt caacacagct taacctgtgt cttcaggtgt      60
tgctgactct catggtgtga cgggcggtgt gtacaaggcc cgggaacgta ttcaccgagg      120
catgctgata cgcgattact agcgattccg acttcatgca ggcgagttgc agcctgcaat      180
ccgaactggg ggtgcttttt tgggattcgc tccggctcgc gccttgcac gcctctgta      240
gcaccattg tagcacgtgt gtagccagc gcataagggg catgatgatt tgacgtcatc      300
ccccacctcc tccgcctcat cgacggcagt ccccttagag tgcccacat tacgcgctgg      360
caactaaggg caggggttgc gctcgttgcg ggacttaacc caacatctca cgacacgagc      420
tgacgacaac catgcaccac ctgtgtccgg gctcctgctc tcatcgaaca ggcacccac      480
cctttcgggc aggtccccgg catgtcaagc cctggtaagg ttcttcgctg tgcttcgaat      540
taaaccacat gctccaccgc ttgtgcgggc ccccgtaaat tcctttgagt ttcaaccttg      600
cggccttact cccagggcgg gatgcttatt gtgttaacta cggcacggag gactccttct      660
ccccacacc tagcatccat cgtttacagc gtggactacc agggatatcta atcctgttcc      720
ctccccacgc tttcgtgctt cagcgtcagt tacgggtccag acggcgcctc tcgccactgg      780
tgttcctccc gatatctaag catttcaccg ctacaccggg aattccggccg tcctctcccg      840
cactcaagct atgcagtatt aagcgcgaatc cttaggttga gcctaaggct ttcacgctta      900
actcgcatag ccgcctacgc accctttacg cccagtaatt cgggacaacg ctcgccacct      960
acgtattacc gggctgctg gcacgtagt agcogtggct ttttaaagg gtaactatctc      1020
ctacttctcc ccgtccaaag aggtttacac cccgaagggc ttcttcctc acgcggcgtc      1080
gctgcgtcag gcttcggccc attgcgcaag attccccgct gctgcctccc gtaggagtgt      1140
gggcctgtgc tcagtcccac tgtggcggta caccctctca ggccggctac ccgtcgtcgc      1200
cttggttaagc cgttacccca ccaactagct gatgggcccg gagcccatcc cca      1253

```

```

5 <210> 6
  <211> 1255
  <212> ADN
  <213> Caldicellulosiruptor

10 <220>
  <221> fuente
  <222> 1..1255
  <223> /organismo="Caldicellulosiruptor"
  /observación="ADNr 16S"
  /tipo_mol="ADN sin asignar"

15 <400> 6

```

ES 2 638 910 T3

gacttcaccc caatcatcag cccacacctc aacacagctt aacctgtgtc ttcaggtggt 60
gctgactctc atggtgtgac gggcggtgtg tacaaggccc gggaacgtat tcaccgcggc 120
atgctgatcc gcgattacta gcgattccga cttcatgcag gcgagttgca gcctgcaatc 180
cgaactgggg gtgctttttt gggattcgct cgggctcgog ccttcgcacg ccctctgtag 240
caccatttgt agcacgtgtg tagcccaggg cataaggggc atgatgattt gacgtcatcc 300
ccaccttctt ccgcctcatc gacggcagtc cccttagagt gccaccatt acgcgctggc 360
aactaagggc aggggttgcg ctcgttgcgg gacttaacct aacatctcac gacaogagct 420
gacgacaacc atgcaccacc tgtgtccggg ctctgtctct catogaacag gcacccacc 480
cttcgggca ggtccccggc atgtcaagcc ctggtaaggt tcttcgcggt gcttogaatt 540
aaaccacatg ctccaccgct tgtgcgggcc ccggtcaatt cctttgagtt tcaaccttgc 600
ggcctactc cccaggcggg atgcttattg tgttaactac ggcacggaag agtccttctc 660
ccccacact agcatccatc gtttacagcg tggactacca gggatatctaa tcctgttcgc 720
tccccacgct ttcgtgcctc agcgtcagtt acggtcaga cgcccgctt cgccactggt 780
gttcctcccg atatctacgc atttcaccgc tacaccggga attccgccgt cctctccgc 840
actcaagcta tgcagtatta agcgcaatcc ttaggttgag cctaaggctt tcacgcttaa 900
ctcgcatagc cgcctacgca ccctttacgc ccagtaattc cggacaacgc tcgccaccta 960
cgtattaccg cggetgctgg cacgtagtta gccgtggett tttaaacggg tactatctcc 1020
tacttctccc cgtccaaaga ggtttacacc ccgaagggtt tcttccctca cgcggcgctg 1080
ctgcgtcagg cttccgcca ttgcgcaaga tccccgctg ctgcctcccg taggagtggt 1140
ggcctgtct cagtcccact gtggcgtac accctctcag gccggctacc cgtcgtcgcc 1200
ttggtgagcc gttacccac caactagctg atgggcccgc agcccatccc cagcc 1255

<210> 7

<211> 1466

5 <212> ADN

<213> *Caldicellulosiruptor*

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1466

<223> /organismo="*Caldicellulosiruptor*"

/observación="ADNr 16S"

/tipo_mol ="ADN sin asignar"

15 <400> 7

ES 2 638 910 T3

```

gacttcaccc ccaatcatca gccccacctt caacacagct taacctgtgt cttcaggtgt      60
tgctgactct catggtgtga cgggcggtgt gtacaaggcc cgggaacgta ttcaccggg      120
catgctgata cgcgattact agcgattccg acttcatgca ggcgagttgc agcctgcaat      180
ccgaactggg ggtgcttttt tgggattcgc tccggctcgc gccttcgcac gccctctgta      240
gcaccattg tagcacgtgt gtagcccagg gcataagggg catgatgatt tgacgtcatc      300
cccaccttcc tccgcctcat cgacggcagt ccccttagag tgcccacat tacgcgctgg      360
caactaaggg caggggttgc gctcgttgcg ggacttaacc caacatctca cgacacgagc      420
tgacgacaac catgcaccac ctgtgtccgg gctcctgctc tcatcgaaca ggacccccac      480
cctttcgggc aggtcccgg catgtcaagc cctggtaagg ttcttcgctg tgcttogaat      540
taaaccacat gctccacgc ttgtgcgggc cccogtcaat tcctttgagt ttcaaccttg      600
cggcogtact cccagggcg gatgcttatt gtgtaacta cggcacggag gagtcttct      660
ccccacacc tagcatccat cgtttacagc gtggactacc aggtatcta atcctgttcg      720
ctccccacgc tttcgtgcct cagcgtcagt tacggctcag acggcgcct tcgccactgg      780
tgttctccc gatatctacg catttcaccg ctacaccggg aattccgccc tcctctccc      840
cactcaagct atgcagtatt aagcgcaatc cttaggttga gcctaaggct ttcacgctta      900
actcgcatag ccgctaagc accctttaag cccagtaatt ccggacaacg ctcgccaact      960
acgtattacc ggggctgctg gcacgtagtt agcogtggct ttttaaacgg gtactatctc     1020
ctacttctcc ccgtccaaag aggtttacac cccgaagggc ttcttccctc acgcggcgtc     1080
gctgcgtcag gcttccgcc attgcgcaag attccccgct gctgcctccc gtaggagtgt     1140
gggcccgtgc tcagtcccac tgtggccgta caccctctca ggccggtac ccgtcgtcgc     1200
cttggtgagc cgttacctca ccaactagct gatgggcccg gagcccatcc ccagccggat     1260
tactcctttc accacatcac catgcgatga cgtgggtcca tcgggtatta gcagcccttt     1320
cgagctgtta tccccgtgct gggggtaggt tgctcacgtg ttactcaccg gtccgcgct     1380
aagatggcag cctccagctc atcaccttca accaccatct ccgctogact tgcctcgctt     1440
aggcacgccg ccagcgttcg tcctga                                           1466

```

5 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /organismo="Secuencia artificial"
 /observación="Cebador para la amplificación del ADNr 16S"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"

15 <400> 8
 agagttgat cmtggctcag 20

20 <210> 9
 <211> 19

ES 2 638 910 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<222> 1..19

<223> /organismo="Secuencia artificial"

/observación="Cebador inverso del ADNr 16S"

/tipo_mol="ADN sin asignar"

10

<400> 9

ggttaccttg ttacgactt

19

REIVINDICACIONES

1. Una DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp. aislada, depositada como DSM 25177, o mutantes de la misma que conservan las propiedades de DIB004C.
- 5 2. Una composición para convertir biomasa lignocelulósica, que comprende una cepa según la reivindicación 1.
3. Un cultivo microbiano que comprende una cepa según la reivindicación 1.

FIGURA 1

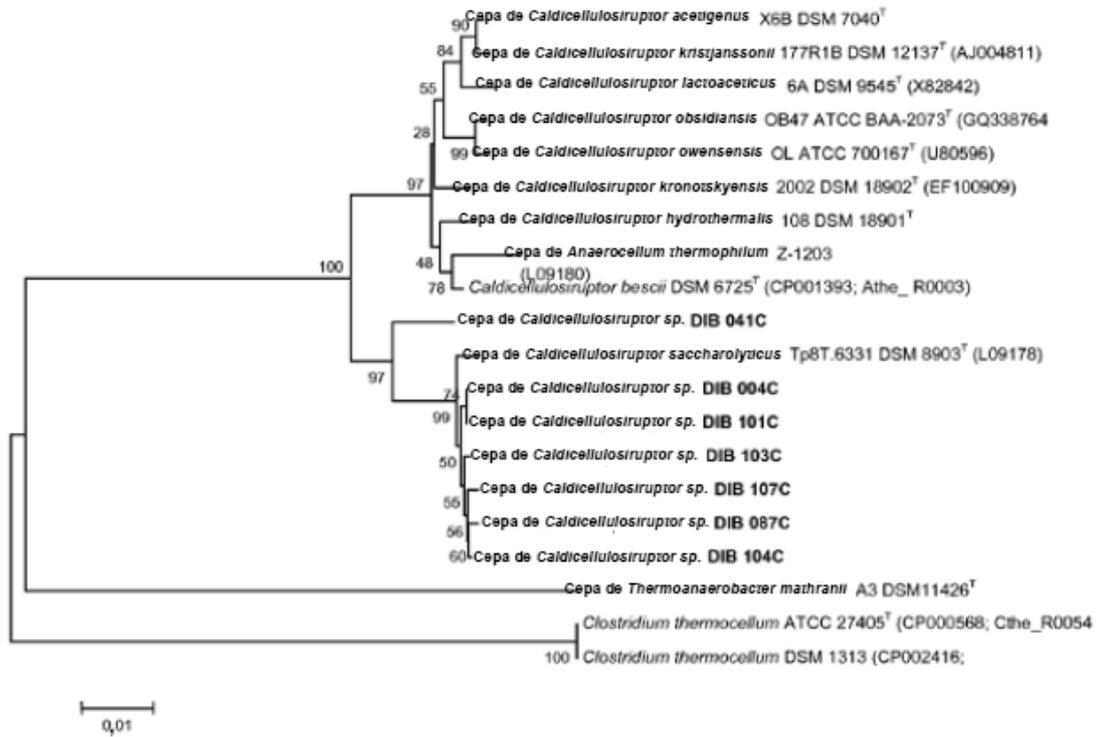


FIGURA 2

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB004C de *Caldicellulosiruptor* sp. (SEQ ID NO: 1)

TTACGACTTC	ACCCCAATCA	TCAGCCCCAC	CTTCAACACA	GCTTAACCTG	TGTCTTCAGG	60
TGTTGCTGAC	TCTCATGGTG	TGACGGGCGG	TGTGTACAAG	GCCCGGGAAC	GTATTCACCG	120
CGGCATGCTG	ATCCCGGAPT	ACTAGCGAPT	CCGACTTCA7	GCAGGCGAGT	TGCAGCCTGC	180
AATCOGAACT	GGGGGTGCTT	TTTTGGGAPT	CGCTCOGGC7	CGCGCCTTCG	CACGCCCTCT	240
GTAGCACCCA	TTGTAGCACG	TGTGTAGCCC	AGGGCATAAG	GGGCATGATG	ATTTGACGTC	300
ATCCCCACCT	TCCTCCGCCT	CATCGACGGC	AGTCCCCCTA	GAGTGCCAC	CATTACGGCG	360
TGGCAACTAA	GGCCAGGGGT	TGGCTCGT	GCGGGACTTA	ACCCAACATC	TCACGACAGG	420
AGCTGACGAC	AACCATGCAC	CACCTGPGTC	CGGGCTCCTG	CTCTCATCGA	ACAGGCACCC	480
CACCCITTCG	GGCAGGTCCC	CGGCATGTCA	AGCCCTGGTA	AGTTCTTCG	CGTTGCTTCG	560
AATTAAACCA	CATGCTCCAC	CGCTTGPGG	GGCCCCGGTC	AATTCCCTTG	AGTTCAACC	600
TTGCCGGCGT	ACTCCCCAGG	CGGGATGCTT	ATGTGTATA	CTACGGCACG	GAGGAGTCCT	660
TCTCCCCCAC	ACCTAGCAFC	CATCGTPTAC	AGCGTGSACT	ACCAGGGTAT	CTAATCCTGT	720
TCGCTCCCCA	CGCTTTCGTC	CCTCAGCGTC	AGTTACGGTC	CAGACGGCCG	CCTTCGCCAC	780
TGGTGTTCCT	CCGATATCT	ACGCATPTCA	CCGCIACACC	GGGAATTCCG	CCGTCCCTTC	840
CCGCACICAA	GCTATGCAGT	ATTAAGCGCA	ATCCTTAGGT	TGAGCCTAAG	GCTTTCACGC	900
TTAACTCGCA	TAGCCGCCFA	CGCACCCCTT	ACGCCAGTA	ATTCGGACA	ACGCTCGCCA	960
CCTACCTATT	ACCGCGGCTC	CTGCCACGTA	CTTAGCCCTC	CCTTTTTAAA	CGGCTACTAT	1020
CTCCTACTTC	TCCCGTCCA	AAGAGGPTTA	CACCCCGAAG	GGCTTCTTCC	CTCACGGGGC	1080
GTGCTGCGT	CAGGCTTCGG	CCCATTGCGC	AAGATTCCCC	GCTGCTGCC	CCCGTAGGAG	1140
TGTGGGCGT	GTCTCAGTCC	CACTGTGGCC	GTACACCCTC	TCAGGCGCGC	TACCCGTCTG	1200
CGCCTTGGTA	GGCCGTACC	CCACCAACTA	GCTGATGGGC	CGCGAGCCCA	TCCCAGCCA	1260
GTATAGCCTC	CCCGGTACC	CTTTCACCAC	ATCACCATGC	GATGACGTGG	TCCCATCGGG	1320
TATTAGCAGC	CCTTTCGAGC	TGTTATCCCC	GTGCTGGGGG	TAGGTTGCTC	ACGTGTACT	1380
CACCCGTCCG	CCGCTA					1396

FIGURA 3

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB041C de *Caldicellulosiruptor* sp. (SEQ ID NO: 2)

CTCAGGACGA	ACGCTGGCGG	CGTGCCTAAC	GCATGCAAGT	CGAGCGGAGG	TAGCCATGAA	60
GGTGAAGAGC	TGGAGTGGCT	ATCTTAGCCG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	GAGCAACCTA	120
CCCTCAGCAC	GGGGATAACA	GCTCGAAAGG	GCTGCTAATA	CCCGATGGGA	CCACGGCATC	180
GCATGATGTT	GTGGTAAAAG	GGTAGCCGTG	GAGGCTATAC	CGGCTGGGGA	TGGGCTCGCG	240
GCCCATCAGC	TAGTTGGTGG	GGTAACGGCC	TACCAAGGCT	ACGACGGGTA	GCCGGCCTGA	300
GAGGGTGGTC	GGCCACAGTG	GGACTGAGAC	ACGGCCACA	CTCCTACGGG	AGGCAGCAGC	360
GGGGAATCTT	GCGCAATGGG	CGAAAGCCTG	ACGCAGCGAC	GCCGCGTGAG	GGAGGAAGCC	420
CTTCGGGGTG	TAAACCTCTT	TGGACGGGGA	GAAGGAGGAG	ATAGTACCCG	TTTAAAAAGC	480
CACGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	TGGCGAGCGT	TGTCGGGAAT	540
TACTGGGCGT	AAAGGGTGCG	TAGGCGGCTA	TGCAAGTTAA	GCCTGAAATC	TTGGGGCTCA	600
ACCCCAAGGC	TGCGCTTAAT	ACTGCATAGC	TTGAGTGCCG	GAGAGGACGG	CGGAATTCCC	660
GGTGTAGCGG	TGAAATGCGT	AGATATCGGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG	CGGCCGTCTG	720
GACCGTAACT	GACGCTGAGG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCGA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	780
AGTCCACGCT	GTAACGATG	GATGCTAGGT	GTGGGGGAGA	AGGACTCCTC	CGTGCCGTAG	840
TTAACACAAT	AAGCATCCCC	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA	GGTTGAAACT	CAAAGGAATT	900
GACGGGGGCC	CGCACAAAGC	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	960
TACCAGGGCT	TGACATGCCG	GGAACCTGCC	CGAAAGGGTG	GGGTGCCTGC	GCGATGAGTG	1020
CAGGAGCCCG	GACACAGGTG	GTGCATGGTT	GTCGTCAGCT	CGTGTCGTGA	GATGTTGGGT	1080
TAAGTCCCGC	AACGAGCGCA	ACCCCTGCCC	TTAGTTGCCA	GCACGTAATG	GTGGGCACCTC	1140
TAAGGGGACT	GCCGCCGATG	AGGCGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAAT	CATCATGCCC	1200
CTTATGCCCT	GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGGTGCTAC	AGAGGGTTGC	GAAGGCGCGA	1260
GCCGGAGCTA	ATCCCAAAAA	AGCACCCCCA	GTTCCGATTG	CAGGCTGCAA	CTCGCCTGCA	1320
TGAAGTCGGA	ATCGCTAGTA	ATCGCGGATC	AGCATGCCGC	GGTGAATACG	TTCCCGGGCC	1380
TTGTACACAC	CGCCCGTCAC	ACCATGAGAG	TCAGCAACAC	CTGAAGACAC	AGGGCAGCTG	1440
TGTTGAAGGT	GGGGCTGATG	ATTGGGGTGA	AGTCGTAACA			1500

FIGURA 4

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB087C de *Caldicellulosiruptor* sp. (SEQ ID NO: 3)

TCAGGACGAA	CGCTGGCGGC	GTGCCTAACG	CATGCAAGTC	GAGCGGAGAT	GGTGGTTGAA	60
GGTGAIGAGC	TGGAGGCTGC	CATCTTAGCG	GCGGACGGGT	GAGTAACACG	TGAGCAACCT	120
ACCCCCAGCA	CGGGGATAAC	AGCTCGAAAG	GGCTGCTAAT	ACCCGATGGG	ACCACGTCAT	180
CBGATGGTGA	TGTGGTGAAA	GGGTAGCCGG	GGAGGCTATA	CTGGCTGGGG	ATGGGCTCGC	240
GGCCCATCAG	CTAGTTGGTG	GGGTAACGGC	TCACCAAGGC	GACGACGGGT	AGCCGGCCTG	300
AGAGGGTGT	CGGCCACAGT	GGGACTGAGA	CACGGCCAC	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	360
CGGGGAATCT	TGCGCAATGG	GCGGAAGCCT	GACGCAGCEA	CGCCGCGTGA	GGGAAGAAGC	420
CCTTCGGGGT	GTA AACCTCT	TGGACGGGG	AGAAGTAGGA	GATAGTACCC	GTTTAAAAAG	480
CCACGGCTAA	CTACGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATAOCTAG	GTGGCGAGCG	TTGTCCGGAA	540
TTACTGGGCG	TAAAGGGTGC	GTAGGCGGCT	ATGCCAGTTA	AGCGTGAAAG	CCTTAGGCTC	600
AACCTAAGGA	TTGCGCTTAA	TACTGCATAG	CITTAGTGGC	GGAGAGGACG	GCGGAATTCC	660
CGGPGIACCG	GTGAAATGCG	TAGATAFCGG	GAGGAACACC	AGTGGCGAAG	GCCGCCGTCT	720
GBACCGTAAC	TGACGCTGAG	GCACGAAAGC	GTGGGGAGCG	AACAGGATTA	GATACCCTGG	780
IAGTCCACGC	TGTAAACGAT	GGATGCTAGG	TGTGGGGGAG	AAGGACTCTT	CCGTGCCGTA	840
GTTAACACAA	TAAGCATCCC	GCCTGGGGAG	TACGGCCGCA	AGGTGAAAC	TCAAAGGAAT	900
TEACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT	GTGGTTAAT	TCGAAGCAAC	GCGAAGAACC	960
TTACCAGGGC	TTGACATGCC	GGGGACCTGC	CCGAAAGGCT	GGGGTGCCTG	TTCGATGAGA	1020
GCAGGAACCC	GGACACAGGT	GGTGCATGCT	TGTCCTCAGC	TCCTGTCTGT	AGATGTTGGG	1080
TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC	AACCCCTGCC	CITTAGTTGCC	AGCCGGTAAT	GGTGGGCACT	1140
CTAAGGGGAC	TGCCGTGCAT	GAGGCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAA	TCATCATGCC	1200
CCTTAIGCCC	TGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGGTGCTA	CAGAGGGCGT	GCGAAGGGCG	1260
GAGCCGGAGC	GAATCCCAAA	AAAGCACCCC	CAGTCCGGAT	TGCAGGCTGC	AACTCGCCCTG	1320
CATGAAGTCG	GAATCGCTAG	TAATCGCGGA	TCAGCATGCC	GCGGTGAATA	CGTTCCCGGG	1380
CCTTGIACAC	ACCGCCCGTC	ACACCATGAG	AGTCAGCAAC	ACCTGAAGAC	ACAGGTTAAG	1440
CTGTGTTGAA	GGTGGGGCTG	ATGATTGGGG	TGAAGTCGTA	A	1481	

FIGURA 5

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB101C de *Caldicellulosiruptor* sp. (SEQ ID NO: 4)

```

CCTGTGTCTT CAGGTGTTTC TCACTCTCAT GGTGTGACGG GCGGTGTGTA CAAGGCCGGG      60
CAACCTATTC ACCCCCCCAT CCTCATCCCC CATTACTACC CATTOCCACT TCATCCACCC      120
GAGTTGCAGC CTGCAATCCG AACTGGGGGT GTTTTTTTGG GATTCGCTCC GGCTCGGGCC      180
TTCGCACGCC CTCTGTAGCA CCCATTGTAG CACGTGTGTA GCCCAGGGCA TAAGGGGCAT      240
GATGATTTGA CGTCATCCCC ACCTTCTCTC GCCTCATCGA CGGCAGTCCC CTFAGAGTGC      300
CCACCATTAC GCGCTGGCAA CTAAGGGCAG GGGTTGCGCT CGTTGCCGGA CTTAACCCAA      360
CATCTCACGA CAGGAGCTGA CGACAACCAT GCACCACCTG TGTCCGGGCT CCTGCTCTCA      420
TCGAACAGGC ACCCCACCTT TTCGGGCAGG TCCCGGGCAT GTCAAGCCCT GGTAAAGTTC      480
TTCGCGTTGC TTGGAATTAA ACCACATGCT CCACCGCTTG TCGGGGCCCC CGTCAATTCC      560
TTGAGTTTC AACCTTGGGG CCGTACTCCC CAGGCGGGAT GCTTATTGTG TTAACTACGG      600
CACGGAGGAG TCGTTCTCCC CCACAOC TAG CATCCATCGT TTACAGCGTG GACTACCAGG      660
GTATCTAATC CTGTTCCGTC CCCACGCTTT CGTGCCTCAG CGTCAGTTAC GGTCCAGACG      720
GCGGCTTCG CCACTGGTGT TCCTCCGGAT ATCTACGCAT TTCACCGCTA CACCGGGAAAT      780
TCCGCGTCC TCPCCGGCAC TCAAGCTATG CAGTATTAAG CGCAATCCTT AGSTTGAGCC      840
TAAGGCTTTC ACGCTTAACT CGCATAGCCG CCTACGCACC CTTTACGGCC AGTAATTCCG      900
GACAACGCTC GCCACCTAOC TATTAOCGGC GCTGCTGGCA CGTAGTTAGC CGTGCCTTTT      960
TAAACGGGTA CTATCTCCTA CTTCTOCCCG TCCAAAGAGG TTTACACCCC GAAGGGCTTC      1020
TTCCTCAGC CGGCGTCCGT GCGTCAGGCT TCCGCCCATT GCGCAAGATT CCCCCTGCT      1080
GCCTCCCGTA GGAGTGTGGG CCGTGTCTCA GTCCCACTGT GGCCTACAC CCTCTCAGGC      1140
CGGTACCCG TCGTCGCCIT GGTAGCCST TACCCACCA ACTAGCTGAT GGCCCGGAG      1200
CCCATCCCA GC      1212
    
```

FIGURA 6

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB103C de *Caldicellulosiruptor* sp. (SEQ ID NO: 5)

CGACTTCACC	CCAATCATCA	GCCCCACCTT	CAACACAGCT	TAACCTGTGT	C TTCAGGTGT	60
TGCTGACTCT	CATGGTGTGA	CGGGCGGTGT	GTACAAGGCC	CGGGAACGTA	TTCACCGCGG	120
CATGCTGATC	CGCSATTACT	AGCGATTCCG	ACTTCATGCA	GGCGAGTTGC	AGCCTGCAAT	180
CCGAAC TGGG	GGTGCTTTTT	TGGGATTCCG	TCCGGCTCGC	GCCTTCGCAC	GCCCTCTGTA	240
GCACCCATTG	TAGCACGTGT	GTAGCCCAGG	GCATAAGGGG	CATGATGATT	TGACGTGATC	300
CCCACCTTCC	TCCGCCTCAT	CGACGGCAGT	CCCCTTAGAG	TGCCACCCAT	TACGCGGTGG	360
CAACTAAGGG	CAGSGGTTGC	GCTCGTTGCG	GGACTTAACC	CAACATCTCA	CGACACGAGC	420
TGACGACAAC	CATGCACCAC	CTGTGTCCGG	GCTCCTGCTC	TCATCGAACA	GGCACCCAC	480
CCTTTCGGGC	AGGTCGCCGG	CATGTCAAGC	CCTGGTAAGG	TTCTTCGGGT	TGCTTCSAAT	540
TAAACCACAT	GCTCCACCGC	TTGTGCGGGC	CCCCGTCAAT	TCCTTTGAGT	TTC AACDTT	600
CGGCCGTACT	CCCCAGGGGG	GATGCTTATT	GTGTAACTA	CGGCACGGAG	GAGTCCPTCT	660
CCCCCACACC	TAGCATCCAT	CGTTTACAGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	ATCCTGPTCG	720
CTCCCCACGC	TTTCGTGCCT	CAGCGTCAGT	TACGGTCCAG	ACGGCCGCCT	TCGCCACTGG	780
TGTTCCCTCC	GATATCTACG	CATTTACCGG	CTACACCGGG	AATTCGGCCG	TCCTCTCCCG	840
CACTCAAGCT	ATGCAGTATT	AAGCGCAATC	C TTAGGTTGA	GCCTAAGGCT	TTCACGGTTA	900
ACTCGCATAG	CGGCCTAAGC	ACCCTTTACG	CCCAGTAATT	CCGSACAACG	CTCGCCACCT	960
ACGTATTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGTGGCT	TTTTAAACGG	G TACTATCTC	1020
CTACTTCTCC	CCGTCCAAAG	AGGTTTACAC	CCCCAAGGGC	TTCTTCCCTC	ACGCGGCGTC	1080
GCTGCGTCAG	GCTTCCGCCC	ATTGCGCAAG	ATTCCCCGCT	GCTGCCTCCC	G TAGGAGTGT	1140
GGGCCGTGTC	TCAGTCCCAC	TGTGGCCGTA	CACCCCTCTCA	GGCCGGCTAC	CCGTCTGTCG	1200
CTTGGAAGC	CGTTACCCCA	CCAACTAGCT	GATGGGCCGC	GAGCCCATCC	CCA	1253

FIGURA 7

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB104C de *Caldicellulosiruptor* sp. (SEQ ID NO: 6)

GACTTCACCC	CAATCATCAG	CCCCACCTTC	AACACAGCCT	AACCTGTGTC	TTCAGGTGTT	60
GCTGACTCTC	A7GGTGTGAC	GGGCGG7GTG	TACAAGGCC	GGGAACGTAT	TCACCGCGGC	120
ATGCTGATCC	GCGATTACTA	GCGATTCCGA	CTTCATGCAG	GCGAGTTGCA	GCCTGCAATC	180
CGAACTGGGG	G7GCTTTTTT	GGGATTCCGT	CCGGCTCGCG	CCTTOGCACG	CCCTCTGTAG	240
CACCCATTGT	AGCACGTGTG	TAGCCCAGGG	CATAAGGGGC	ATGATGATTT	GACGTCATCC	300
CCACCTTCCT	CCGCTCATC	GACGGCAGTC	CCCTTAGAGT	GCCCACCATT	ADGCGCTGGC	360
AACTAAGGGC	AGGGGTTGCG	CTCGTTGCGG	GACTTAACCC	AACAATCTAC	GACACGAGCT	420
GACGACAACC	A7GCACCACC	TGTGTCCGGG	CTCC7GCTCT	CATCGAACAG	GCACCCACC	480
CTTTCCGGGA	GGTCCCCGGC	ATGTCAAGCC	CTGGTAAGGT	TCTTCGCGTT	GCTTCGAATT	540
AAACCACATG	CTCCACCCT	TGTGCGGGCC	CCCGTCAATT	CCTTTGAGTT	TCAACCTTGC	600
GGCGTACTC	CCCAGGCGGG	ATGCTTATTG	TGTTAACTAC	GGCAOGGAAG	AGTCCTTCTC	660
CCCCACACCT	AGCATCCATC	CTTTACAGCG	TGGACTADCA	GGTATCTAA	TCCTGTCCG	720
TCCCCAGGCT	TTCGTGCCCTC	AGCGTCAGTT	ACGGTCCAGA	CGGCCGCCTT	CGCCACTGGT	780
GTTCCTCCCG	A7ATCTACGC	ATTTCACCGC	TACACCGGGA	ATTCCGCGGT	CCTCTCCCGC	840
ACTCAAGCTA	TGCAGTAPTA	AGCGCAATCC	TTAGGTTGAG	CCTAAGGCTT	TCACGCTTAA	900
CTCCCATAGC	CGCCTACGCA	CCCTTTACGC	CCAGTAATTG	CGGACAACGC	TCGCCACCTA	960
CGTATTACCG	CGGCTGCTGG	CACGTAGTAA	GCCGTGGCTT	TTTAAACGGG	TACTATCTCC	1020
TACTTCTCCC	CGTCCAAAGA	GGTTTACACC	CCGAAGGGCT	TCTTCCCTCA	CGCGGCGTCC	1080
CTGCGTACAG	C7TCCGCCCA	TTCGCCAAGA	TTCCCGCGTG	CTGCCTCCCG	TAGGACTGTG	1140
GGCGGTGTCT	CAGTCCCCT	GTGGCCGTAC	ACCCCTCTEAG	GCCGGCTACC	GSTCSTCGCC	1200
TTGGTGAGCC	G7TACCCAC	CAACTAGCTG	ATGGGCCGCG	AGCCCATCCC	CAGCC	1255

Figura 8

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB107C de *Caldicellulosiruptor* sp. (SEQ ID NO: 7)

GACTTCACCC	CCAATCATCA	GCCCCACCTT	CAACACAGCT	TAACCTGTGT	CTTCAGGTGT	60
TGCTGACTCT	CATGTTGTCA	CGGGCGGTGT	GTACAAGGCC	CGGGAACGTA	TTCACCGCGG	120
CATGCIGATC	CBCGATTACT	AGCGATTCCG	ACTTCATGCA	GGCGAGTTGC	AGCCTGCAAT	180
CCGAACCTGG	GGTGCTTTTT	TGGGATTDCG	TCCGGCTCGC	GCCTTCGCAC	GCCCTCTGTA	240
CCACCCATTG	TAGCACGTGT	GTAGCCCAGG	GCATAAGGGG	CATGATGATT	TGACGTCATC	300
CCCACCTTCC	TCCGCCTCAT	CGACGGCAGT	CCCCTTAGAG	TGCCACCCAT	TACGCGCTGG	360
CAACTAAGGG	CAGGGGTTGC	GCTCGTTGCG	GGACTTAACC	CAACATCTCA	CGACACGAGC	420
TGACGACAAC	CATGCACCAC	CTGTGTCCGG	GCTCCTGCTC	TCATCGAACA	GGCACCACAC	480
CCTTTTCGGG	AGGTCCCCGG	CATGTCAAGC	OCTGGTAAGG	TTCTTCGCGT	TGCTTCGAAT	540
TAAACCACAT	GCTCCACCGC	TTGTGCGGGC	CCCCGTCAAT	TCCTTTGAGT	TTCAACCTTG	600
CGGCCGTACT	CCCAGGCGG	GATGCTTATT	GTGTTAACTA	CGGCACGGAG	GAGTCCTTCT	660
CCCCACACC	TAGCATCCAT	CGTTTACAGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	ATCCTGTTCC	720
CTCCCCACGC	TTTCGTGCTT	CAGGTCAGT	TACGGTCCAG	ACGGCCGCCT	TCGCCACTGG	780
TGTTCCCTCC	GATAICTACG	CATTTCACCG	CTACACCGGG	AATTCCGCGG	TCCTCTCCCG	840
CACTCAAGCT	ATGCAGTATT	AAGCGCAATC	CTTAGGTTGA	GCCTAAGGCT	TTACCGCTTA	900
ACTCGCATAG	CCGCCTACGC	ACCCTTTACG	CCCAGTAATT	CCGGACAACG	CTCGCCACCT	960
ACGTATTACC	GCGGCTGCIG	GCACGTASTT	AGCCGTGGCT	TTTTAAACGG	GTAATATCTC	1020
CTACTICTCC	CCGTCCAAAG	AGGTTTACAC	CCCGAAGGGC	TTCTTCCTTC	ACGCGGCGTC	1080
GCTGCGTCAG	GCTTCGCCCC	ATTGCGCAAG	ATTCCCCGCT	GCTGCCCTCC	GTAGGAGTGT	1140
GGCCCGTGT	TCAGTCCAC	TGTGGCCBTA	CACCCCTCTA	GGCCGGCTAC	CCGTCTGTGC	1200
CTTGGIGAGC	CGTTACCTCA	CCAACTAGCT	GATGGGCCGC	GAGCCCATCC	CCAGCCGGAT	1260
TACTCCTTTC	ACCACATCAC	CATGCCATGA	CGTGGTCCCA	TCGGGTATTA	GCAGCCCTTT	1320
CGAGCIGTTA	TCCCCGTGCT	GGGGGTAGGT	TGCTCACGTG	TACTCACCC	GTCCGCGGCT	1380
AAGATGGCAG	CCTCCAGCTC	ATCACCTTCA	ACCACCATCT	CCGCTCGACT	TGCATGCGTT	1440
AGGCACGCGG	CCAGCGTTCC	TCCTGA				1446

Figura 9

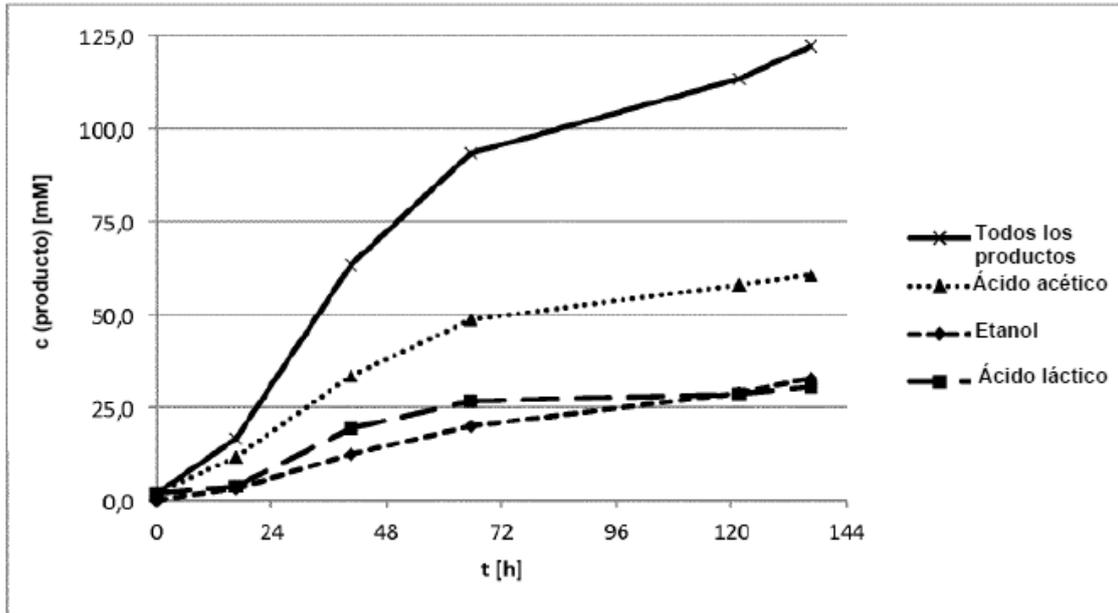


Figura 10

Cepa	Sustrato + concentración	Tiempo de incubación	Lactato formado	Etanol formado	Acetato formado
	mM o (equivalente monomérico de mM)	h	mM	mM	mM
DIB004C	Celulosa (26 mM)	96	9,6	1,6	4,8
	Celobiosa (25 mM)	96	18,8	0,3	8,6
	Glucosa 25 mM	96	19,6	1,2	6,4
	Xilano (31 mM)	96	13,2	1,5	9,6
	Xilosa 30 mM	96	18,6	3,2	2,5
	Álamo (12 mM) ¹⁾	168	12,5	2,1	7,4
DIB041C	Celulosa (26 mM)	168	14,3	2,7	10,2
	Celobiosa (25 mM)	72	15,1	1,7	8,4
	Glucosa 25 mM	72	17,6	1,3	8,5
	Xilano (31 mM)	72	17,4	1,4	9,5
	Xilosa 30 mM	72	16,9	1,2	8,9
DIB087C	Celulosa (26 mM)	168	7,4	1,9	12,9
	Celobiosa (25 mM)	72	8,1	1,6	10,8
	Glucosa (25 mM)	72	7,1	1,8	14,4
	Xilano (31 mM)	72	8,3	1,4	13,7
	Xilosa 30 mM	72	7,6	1,3	13,9
DIB101C	Celulosa (26 mM)	96	6,6	1,1	6,9
	Celobiosa (25 mM)	168	14,8	2,6	11,1
	Glucosa 25 mM	168	12,7	1,5	9,7
	Xilano (31 mM)	96	9,4	2,2	10,0
	Xilosa 30 mM	96	10,5	5,1	4,8
	Álamo (12 mM) ^{1)J}	168	6,9	2,7	10,2
DIB103C	Celulosa (26 mM)	168	15,3	2,0	7,1
	Celobiosa (25 mM)	72	15,7	1,1	6,8
	Glucosa (25 mM)	72	17,5	1,1	6,7
	Xilano (31 mM)	72	15,9	1,1	6,2
	Xilosa 30 mM	72	16,1	1,0	6,5
DIB104C	Celulosa (26 mM)	72	16,3	2,1	7,8
	Xilosa 30 mM	72	16,6	1,6	8,6
	Xilosa 30 mM	72	16,8	1,7	8,1
	Xilano (31 mM)	72	15,1	1,4	9,0
	Xilosa 30 mM	72	12,9	1,4	10,1
DIB107C	Celulosa (26 mM)	168	14,3	2,4	9,5
	Celobiosa (25 mM)	72	17,4	1,6	6,4
	Glucosa 25 mM	72	14,1	1,8	9,3
	Xilano (31 mM)	72	13,8	1,3	9,9
	Xilosa 30 mM	72	12,6	1,2	9,7
DSM8903	Celulosa (26 mM)	168	6,6	1,4	5,7
	Celobiosa (25 mM)	96	13,2	1,9	7,6
	Glucosa 25 mM	96	14,2	1,7	7,8
	Xilano (31 mM)	96	7,7	1,8	10,2
	Xilosa 30 mM	96	14,7	2,9	4,1

¹⁾ Madera de álamo pretratada, sin azúcares libres

Figura 11

Sustratos pretratados con vapor		Ácido láctico [mM]	Ácido acético [mM]	EtOH [mM]
<i>Miscanthus</i>	DIB004C	2,1	11,1	1,8
	DIB101C	1,6	11,6	1,4
Paja de trigo	DIB004C	1,1	10,7	1,4
	DIB101C	1,1	8,6	1,2
Baqazo de caña de azúcar	DIB004C	2,1	11,1	3,4
	DIB101C	2,4	8,9	2,1
Tallos de maíz	DIB004C	2,1	13,6	2,5
	DIB101C	1,3	13,7	1,7
Mazorcas de maíz	DIB004C	4,6	15,5	3,5
	DIB101C	5,3	15,7	2,1
Plantas de maíz enteras	DIB004C	1,4	11,4	2,3
	DIB101C	1,1	10,0	1,3
Plantas de sorgo dulce	DIB004C	1,9	10,4	1,9
	DIB101C	1,2	9,8	1,4
Madera de álamo	DIB004C	3,1	10,0	2,5
	DIB101C	2,0	10,7	1,7
Madera de abeto	DIB004C	3,3	9,2	4,1
	DIB101C	3,0	11,0	2,0
Tallos de algodón	DIB004C	1,0	4,6	0,6
	DIB101C	0,8	4,1	0,3
Avicel (sin tratar)	DIB004C	9,3	21,6	3,4
	DIB101C	8,2	22,5	3,3