

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 265**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12P 7/14 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)
C12P 39/00 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2013 PCT/EP2013/064256**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009273**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2013 E 13739375 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2872616**

54 Título: **Métodos y cultivos microbianos para la conversión mejorada de la biomasa lignocelulósica**

30 Prioridad:

10.07.2012 EP 12175673
10.07.2012 US 201261669962 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CURVERS, SIMON y
SVETLITCHNYI, VITALY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 265 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

Métodos y cultivos microbianos para la conversión mejorada de la biomasa lignocelulósica

Campo de la descripción

5 La presente descripción se refiere a métodos y cultivos microbianos para convertir biomasa lignocelulósica en biocombustibles y/u otros productos químicos basados en carbono.

Antecedentes

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

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

15 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 proteínas, pectinas, ceras y otros compuestos orgánicos. La biomasa celulósica es un vasto recurso mal explotado y, en algunos casos, un problema de residuos. Sin embargo, las hexosas de la celulosa pueden ser convertidas por las levaduras en el combustible etanol para el cual existe una demanda creciente. Las pentosas de hemicelulosa todavía no pueden ser convertidas en etanol comercialmente, pero se están desarrollando varios microorganismos etanologénicos
20 prometedores con la capacidad de convertir pentosas y hexosas.

Típicamente, 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. El método de pretratamiento más utilizado es la hidrólisis ácida, en la que el material lignocelulósico se somete a un ácido tal como el ácido sulfúrico, mediante el cual los polímeros de azúcar celulosa y hemicelulosa se hidrolizan total o
25 parcialmente a sus monómeros de azúcar constituyentes y se destruye la estructura de la biomasa facilitando el acceso de las enzimas hidrolíticas en las etapas de procesamiento subsiguientes. Otro tipo de hidrólisis de lignocelulosa es la explosión de vapor, un proceso que comprende calentar el material lignocelulósico por inyección de vapor a una temperatura de 190-230°C. Un método adicional es la oxidación en húmedo, en la que el material se trata con oxígeno a 150-185°C. Los pretratamientos pueden ser seguidos por hidrólisis enzimática para completar la
30 liberación de monómeros de azúcar. Esta etapa de pretratamiento da lugar a la hidrólisis de celulosa en glucosa mientras que la hemicelulosa se transforma parcial o completamente en las pentosas xilosa y arabinosa y las hexosas glucosa, manosa y galactosa. Así, 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 tanto azúcares de hexosa como de pentosa en productos de
35 fermentación deseados tales como etanol.

Después del pretratamiento, los esquemas de procesamiento de biomasa lignocelulósica que implican hidrólisis enzimática o microbiana implican habitualmente cinco transformaciones biológicamente mediadas: (1) la producción de enzimas sacarolíticas (celulasas y hemicelulasas); (2) la hidrólisis de componentes de carbohidratos presentes en la biomasa pretratada a azúcares; (3) la fermentación de azúcares de hexosa (por ejemplo, glucosa, manosa y galactosa); (4) la fermentación de azúcares de pentosa (por ejemplo, xilosa y arabinosa) y (5) la conversión de
40 alcoholes de azúcar como sorbitol, manitol o xilitol.

Cada etapa de procesamiento puede hacer que el proceso general sea más costoso y, por lo tanto, disminuya 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
45 procesamiento necesarias para convertir el material biológico celulósico en biocombustible y otros materiales comercialmente deseables.

Las cinco transformaciones biológicamente mediadas pueden ocurrir en un solo paso en una configuración de proceso llamada bioprocesamiento consolidado (CBP), que se distingue de otras configuraciones menos integradas en que CBP no implica un paso de proceso dedicado 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.
50

Los procesos actuales del CBP incluyen un pretratamiento extensivo y costoso del material mediante procesos mecánicos, termoquímicos y bioquímicos. Generalmente, los objetivos de tales procedimientos de pretratamiento incluyen (1) hacer que los polímeros celulósicos y hemicelulósicos sean más accesibles a los microorganismos, y (2) convertir los complejos polisacáridos celulósicos y hemicelulósicos en azúcares fermentables más sencillos u otros
55 compuestos simples, que se convierten más fácilmente en combustibles y otros productos químicos por

microorganismos. Los procesos mecánicos, termoquímicos y bioquímicos utilizados frecuentemente en el pretratamiento de material lignocelulósico constituyen un coste mayor y no son completamente efectivos.

Además, los microorganismos utilizados actualmente para la producción de combustibles y otros productos químicos a partir de material lignocelulósico carecen de la maquinaria celular necesaria para descomponer los complejos polisacáridos vegetales en azúcares (sacarificación) y luego convertir los diversos azúcares resultantes en combustibles y otros productos químicos en una manera eficiente.

Idealmente, las características deseables de diferentes microorganismos podrían ser utilizadas simultáneamente por fermentación de biomasa lignocelulósica con co-cultivos de los microorganismos. Sin embargo, las condiciones óptimas para la fermentación de la biomasa lignocelulósica varían mucho de una especie a otra. Bajo las condiciones más favorables, los monocultivos de bacterias pueden replicarse muy rápidamente y producir eficientemente el producto de fermentación deseado. Sin embargo, debido a la presión evolutiva, cuando un co-cultivo de microorganismos está presente, las especies que pueden crecer más rápido a menudo son dominantes. Muchas variables influyen en el éxito de la fermentación bacteriana de la biomasa lignocelulósica, incluyendo pero sin limitarse a: temperatura, pH, medio de crecimiento y protocolo de pretratamiento. La identificación de la pequeña ventana de condiciones adecuadas para co-cultivar al menos dos microorganismos, mientras que los organismos fermentan simultáneamente la biomasa lignocelulósica, presenta un desafío significativo. El documento WO 2010/075213 A2 describe un cultivo microbiano que comprende *Caldicellulosiruptor* y *Thermoanaerobacter* para convertir biomasa lignocelulósica en etanol y/o ácido láctico.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad insatisfecha sustancial de procesos de bioconversión que aprovechen mejores microorganismos y/o combinaciones de microorganismos para convertir un espectro más amplio de biomasa lignocelulósica y sacarificar polisacáridos complejos a azúcares fermentables para fermentar combustibles y otros productos químicos.

Por lo tanto, sería ventajosa la disponibilidad de nuevos microorganismos y/o combinaciones de microorganismos para convertir la biomasa lignocelulósica en altos niveles de productos químicos basados en carbono.

25 **Resumen de la descripción**

La presente invención se define de acuerdo con las reivindicaciones y pertenece a un cultivo microbiano aislado adecuado para convertir biomasa lignocelulósica en un biocombustible y/u otra sustancia química basada en carbono que comprende un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* y un segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter*, en el que a) el primer microorganismo se selecciona del grupo que consiste en DIB004C depositado como DSM 25177, DIB101C depositado como DSM 25178, DIB041C depositado como DSM 25771, DIB107C depositado como DSM25772, DIB101C depositado como DSM 25178, DIB103C depositado como DSM 25773, DIB104C depositado como DSM 25774 y DIB107C depositado como DSM 25775, y en el que b) el segundo microorganismo se selecciona del grupo que consiste en DIB004G depositado como DSM 25179, DIB101G depositado como DSM 25180, DIB101X depositado como DSM 25181, DIB097C depositado como DSM 25308, DIB087G depositado como DSM 25777, DIB103X depositado como DSM 25776, DIB104X depositado como DSM 25778 y DIB107X depositado como DSM 25779.

En un segundo aspecto, la descripción se refiere a cultivos microbianos adecuados para convertir la biomasa lignocelulósica en un biocombustible y/u otro compuesto químico a base de carbono que comprende un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* y un segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter*.

En un tercer aspecto, la descripción se refiere a métodos para convertir biomasa lignocelulósica en un biocombustible u otro producto basado en carbono, que comprende la etapa de poner en contacto biomasa lignocelulósica con un cultivo microbiano de acuerdo con la presente descripción durante un periodo de tiempo a una temperatura inicial y un pH inicial, produciendo de ese modo una cantidad de un biocombustible y/u otros productos químicos basados en carbono.

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

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a procedimientos para producir un biocombustible tal como etanol y/u otros productos químicos basados en carbono. En una realización, el procedimiento comprende someter biomasa que incluye materiales vegetales que contienen celulosa y hemi-celulosa a la fermentación en condiciones termófilas en presencia de co-cultivos de nuevas células bacterianas termófilas celulolíticas aisladas pertenecientes al género *Caldicellulosiruptor* y nuevas células bacterianas termófilas sacarolíticas aisladas y/o xilanolíticas pertenecientes al género *Thermoanaerobacter*.

En consecuencia, la presente descripción se refiere al uso de cepas microbianas seleccionadas del grupo que consiste en *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (DSMZ número de acceso 25177), *Caldicellulosiruptor* sp. DIB101C (número de acceso DSMZ 25178), *Caldicellulosirupror* sp. DIB041C (número de acceso DSMZ 25771), *Caldicellulosiruptor* sp. DIB087C (número de acceso DSMZ 25772), *Caldicellulosiruptor* sp. DIB103C (número de acceso DSMZ 25773), *Caldicellulosiruptor* sp. DIB104C (número de acceso DSMZ 25774) y *Caldicellulosiruptor* sp. DIB107C (número de acceso DSMZ 25775), *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSMZ número de acceso 25179), *Thermoanaerobacter* sp. DIB101G (número de acceso DSMZ 25180), *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X (número de acceso DSMZ 25181), *Thermoanaerobacter* sp. DIB97X (número de acceso DSMZ 25308), *Thermoanaerobacter* sp. DIB87G (número de acceso DSMZ 25777), *Thermoanaerobacter* sp. DIB103X (número de acceso DSMZ 25776), *Thermoanaerobacter* sp. DIB104X (número de acceso DSMZ 25778), *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (número de acceso DSMZ 25779) así como cualquier combinación de dichas cepas y cualesquiera homólogos de las mismas para la producción de biocombustibles y/u otros productos químicos basados en carbono.

Antes de describir la descripción en detalle, debe entenderse que esta descripción no está limitada a las partes componentes particulares de los dispositivos descritos o a las etapas del procedimiento de los métodos descritos ya que tales dispositivos y métodos pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria es con fines de describir únicamente las realizaciones particulares y no pretende ser limitativa. Debe tenerse en cuenta que, tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referentes singulares y/o plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, debe entenderse que, en el caso de que se den intervalos de parámetros que están delimitados por valores numéricos, se considera que los intervalos incluyen estos valores de limitación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un gráfico de barras que muestra la formación del producto de las cepas *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (A) y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (B) solo o en co-cultivo de ambas cepas (C) para diversos sustratos técnicos.

La FIG. 2 muestra un gráfico de barras que muestra los aumentos factoriales en la formación total del producto y la formación de etanol comparando la cepa hidrolítica *Caldicellulosiruptor* DIB004C y el co-cultivo de esta cepa con *Thermoanaerobacter* DIB004G.

La FIG.3 es un diagrama que muestra la formación del producto durante el crecimiento de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C sobre 20 g/L de concentración en peso seco de madera de álamo pretratada por explosión de vapor (PO-STEX)

La FIG.4 es un diagrama que muestra la formación del producto durante el crecimiento de un co-cultivo que comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G sobre 20 g/l de concentración en peso seco de madera de álamo pretratada por explosión de vapor (PO-STEX)

La FIG.5 es un diagrama que muestra una comparación directa de la formación total del producto entre *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C solo y un co-cultivo de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C con *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G sobre 20 g/l de concentración en peso seco de madera de álamo pretratada por explosión de vapor (PO-STEX).

La FIG.6 ilustra un árbol de unión de vecinos basado en comparaciones de la secuencia de genes de 16S rRNA de cepas aisladas de *Caldicellulosiruptor* sp. y bacterias seleccionadas. Los valores de "Bootstrap" se basaron en 1.000 repeticiones. La barra de escala representa un cambio de 0,01 por posición de nucleótido. Los números de acceso del GenBank se indican entre paréntesis. T, tipo cepa.

La FIG.7 ilustra un árbol de unión de vecinos basado en comparaciones de la secuencia de genes de 16S rRNA de cepas de *Thermoanaerobacter* sp. aisladas y bacterias seleccionadas. Los valores de "Bootstrap" se basaron en 1.000 repeticiones. La barra de escala representa un cambio de 0,01 por posición de nucleótido. Los números de acceso de GenBank se indican entre paréntesis. T, tipo cepa.

La FIG.8 muestra un 16S rDNA de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (SEQ ID NO: 1)

La FIG.9 muestra un 16S rDNA de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB041C (SEQ ID NO: 2)

La FIG.10 muestra un 16S rDNA de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB087C (SEQ ID NO: 3)

La FIG.11 muestra un 16S rDNA de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB101C (SEQ ID NO: 4)

La FIG.12 muestra un 16S rDNA de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB103C (SEQ ID NO: 5)

La FIG.13 muestra un 16S rDNA de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB104C (SEQ ID NO: 6)

La FIG.14 muestra un 16S rDNA de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB107C (SEQ ID NO: 7)

La FIG.15 muestra un 16S rDNA de *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (SEQ ID NO: 8)

La FIG.16 muestra un 16S rDNA de *Thermoanaerobacter* sp. DIB087G (SEQ ID NO: 9)

La FIG.17 muestra un 16S rDNA de *Thermoanaerobacter* sp. DIB097X (SEQ ID NO: 10)

La FIG.18 muestra un 16S rDNA de *Thermoanaerobacter* sp. DIB101G (SEQ ID NO: 11)

5 La FIG.19 muestra un 16S rDNA de *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X (SEQ ID NO: 12)

La FIG.20 muestra un 16S rDNA de *Thermoanaerobacter* sp. DIB103X (SEQ ID NO: 13)

La FIG.21 muestra un 16S rDNA de *Thermoanaerobacter* sp. DIB104X (SEQ ID NO: 14)

La FIG.22 muestra un 16S rDNA de *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (SEQ ID NO: 15)

Descripción detallada de la descripción

10 Los aspectos de la presente descripción se refieren a nuevos métodos consolidados de bioprocesamiento (CBP) mediante los cuales se puede aumentar la eficiencia de la producción de biocombustibles y/u otras sustancias químicas basadas en carbono a partir de materiales celulósicos que contienen biomasa. En particular, la presente descripción proporciona numerosos co-cultivos microbiológicos para aumentar la eficiencia de la producción de etanol y/o ácido láctico a partir de biomasa.

15 La presente descripción se refiere a métodos, microorganismos y co-cultivos microbianos 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, astillas de madera de álamo o hierba como miscanto, a un producto económicamente deseable tal como, por ejemplo, un biocombustible (por ejemplo, un alcohol y/o gas hidrógeno (H₂)), polímero, y/o producto químico a base de carbono como el ácido láctico.

20 Además, la presente descripción se refiere a métodos, microorganismos y composiciones útiles para convertir azúcares como poli-, oligo-, di- y/o mono-sacáridos, en particular di- y/o mono-sacáridos de hexosas y/o poli-, oligo-, di- y/o mono-sacáridos de pentosas para producir productos químicos basados en carbono tales como etanol y/o ácido láctico.

25 Un aspecto de la descripción se refiere a métodos para la conversión de biomasa lignocelulósica en biocombustible y/u otro químico basado en carbono que utiliza co-cultivos de al menos dos microorganismos extremadamente termófilos, un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* y un segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter*.

30 El término "co-cultivo" y/o la expresión "cultivo microbiano", tal como se utiliza en la presente descripción, es una mezcla de al menos dos microorganismos diferentes (un primer y segundo microorganismo) que se han reproducido en medios de cultivo predeterminados bajo condiciones de laboratorio controladas, ya sea juntos o por separado. Además, el término "co-cultivo" significa una mezcla de al menos dos microorganismos diferentes, en donde los microorganismos son primero mezclados dentro del recipiente de reacción, p. ej., el recipiente para convertir la biomasa en productos químicos a base de carbono como etanol y/o ácido láctico. El co-cultivo se puede añadir a la biomasa simultáneamente, independientemente y/o con un cambio de tiempo entre la adición del primer microorganismo y el segundo microorganismo.

35 El término "xilanolítico" pretende incluir la capacidad de hidrolizar enlaces glicosídicos en oligopentosas y polipentosas. El término "celulolítico" pretende incluir la capacidad de hidrolizar parcialmente, sustancialmente o completamente celulosa o cualquiera de sus constituyentes. La actividad celulolítica también puede incluir la capacidad de despolimerizar o desramificar celulosa y hemicelulosa.

40 Por "extremadamente termófilico" se entiende un organismo capaz de crecer a una temperatura de 70°C o superior. Por "mesófilo" se entiende un organismo que crece a una temperatura de aproximadamente 20°C-45°C.

45 Las expresiones "biomasa lignocelulósica" y "biomasa celulósica" significan cualquier tipo de biomasa que comprende celulosa, hemicelulosa, lignina o combinaciones de las mismas, tales como, pero sin limitarse a, biomasa leñosa, hierbas forrajeras, cultivos herbáceos energéticos, biomasa de plantas no madereras, desechos agrícolas y/o residuos agrícolas, residuos forestales y/o desechos forestales, lodos de la producción del papel y/o lodos de residuos del papel, lodos de tratamiento de aguas residuales, residuos sólidos municipales, fibra de maíz procedente de plantas de etanol de maíz molido, húmedo y seco, y residuos de procesamiento del azúcar. En particular, la expresión "biomasa lignocelulósica" de acuerdo con la presente descripción debe entenderse también en su sentido más amplio, de modo que aparte de la madera, los residuos agrícolas y los cultivos energéticos, también comprenden diferentes tipos de residuos tanto de la industria como de los hogares. Puede tratarse de cualquier biomasa que contenga celulosa y/o hemicelulosa, incluyendo césped, pastos, gramíneas, pasto de centeno, hierba cinta, pasto mixto de pradera, miscanto, residuos de elaboración del azúcar, bagazo de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, residuos agrícolas, paja de arroz, cascarilla del arroz, paja de cebada, mazorcas de maíz, paja de

- cereal, paja de trigo, paja de canola, paja de avena, cascarones de avena, fibra de maíz, hojarasca, hojarasca de soja, hojarasca de maíz, desechos forestales, fibra de pulpa de madera reciclada, lodos de papel, serrín, madera dura y madera blanda, moldura de remolacha azucarera, tallos de algodón, hojas de plátano, residuos de procesamiento de aceite de palma y material de biomasa lignocelulósica obtenido mediante el procesamiento de plantas alimenticias. En realizaciones ventajosas, el material de biomasa lignocelulósica es hierba y/o madera dura, preferiblemente césped de miscanthus y/o madera de álamo. En particular, se pretende designar una biomasa lignocelulósica no tratada y/o una biomasa lignocelulósica que ha sido sometida a una etapa de pretratamiento, por ejemplo, el material lignocelulósico se ha separado, al menos parcialmente, en celulosa, hemicelulosa y lignina, con lo que se ha aumentado el área superficial del material.
- 5
- 10 Tal como se utiliza en la presente memoria, un crecimiento "eficiente" se refiere al crecimiento en el que las células pueden cultivarse hasta una densidad especificada dentro de un tiempo especificado.
- La celobiosa es un disacárido derivado de la condensación de dos moléculas de glucosa unidas en un enlace β (1 \rightarrow 4). Se puede hidrolizar para dar glucosa. La celobiosa tiene ocho grupos alcoholes libres (OH), uno de enlace y dos enlaces hemiacetales, que dan lugar a fuertes enlaces de hidrógeno inter- e intra-moleculares. Es un tipo de carbohidrato dietético que también se encuentra en las setas.
- 15
- La expresión "ácido orgánico" es conocida en la técnica. El término "ácido láctico" se refiere al ácido orgánico ácido 2-hidroxipropiónico en la forma de ácido libre, en la forma de sal así como en sus ésteres o anhídridos. La forma de sal de ácido láctico es el "lactato", independientemente del agente neutralizante, es decir, carbonato de calcio o hidróxido de amonio.
- 20 La expresión "ácido acético" se refiere al ácido orgánico ácido metanocarboxílico, también conocido como ácido etanoico, ya sea en forma de ácido libre o en forma de sal. La forma de sal del ácido acético se denomina "acetato".
- Una cepa, célula o "homólogo" de microorganismo, como se usa en la presente memoria, se considera cualquier microorganismo que no es significativamente diferente por medio de homología de ADN como se ha definido anteriormente y exhibe las mismas o similares propiedades fisiológicas descritas en los ejemplos de la presente memoria.
- 25
- El término "mutante", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una célula bacteriana en la que el genoma, incluyendo uno o más cromosomas o ADN extra-cromosómico potencial, ha sido alterado en una o más posiciones, o en el que se ha añadido o eliminado ADN.
- El término "progenie" se refiere a un producto de reproducción bacteriana, un nuevo organismo producido por uno o más progenitores.
- 30
- La expresión "relación ADN-ADN", en particular, se refiere al porcentaje de similitud del ADN genómico o entero de dos microorganismos, según se mide mediante el ensayo de hibridación/renaturalización ADN-ADN de acuerdo con 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 ADN-ADN se realiza preferiblemente por el Servicio de Identificación DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania).
- 35
- La expresión "similitud de la secuencia génica 16S rDNA" se refiere en particular al porcentaje de nucleótidos idénticos entre una región de la secuencia de ácido nucleico del gen 16S RNA ribosómico (rDNA) de un primer microorganismo y la región correspondiente de la secuencia de ácido nucleico del gen 16S rDNA 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, más preferiblemente aproximadamente 480 nucleótidos consecutivos.
- 40
- La expresión "un microorganismo", tal como se utiliza en la presente memoria, puede referirse sólo a un organismo unicelular, así como a numerosos organismos unicelulares únicos. 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*. Por ejemplo, la expresión "un microorganismo del género *Thermoanaerobacter*" puede referirse a una sola célula bacteriana de *Thermoanaerobacter* del género *Thermoanaerobacter*, así como a múltiples células bacterianas del género *Thermoanaerobacter*. En general, la expresión "un microorganismo" se refiere a numerosas células. En particular, dicha expresión se refiere a al menos 10^3 , preferiblemente al menos 10^4 células, al menos 10^5 o al menos 10^6 células.
- 45
- 50
- Al explotar ciertas características deseables de cada organismo en el cultivo microbiano de acuerdo con la presente descripción, se producen niveles inesperadamente altos de, por ejemplo, etanol y/o ácido láctico en comparación con los niveles de etanol y/o ácido láctico producidos en monocultivos de los microorganismos individuales. Un primer microorganismo capaz de utilizar celulosa y hemicelulosa (celulolítica y sacarolítica) se combina con un segundo microorganismo capaz de utilizar poli-, oligo-, di- y/o mono-sacáridos (xilanolíticos y/o sacarolíticos) en ciertas realizaciones de la descripción. En este sentido, los esfuerzos de los microorganismos son ortogonales, pero
- 55

complementarios. Los procesos que utilizan co-cultivos, por lo tanto, ofrecen beneficios significativos respecto a los procesos basados en monocultivos estándar.

5 Sorprendentemente, la combinación específica de un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* y un segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter* da lugar a mayores índices de producción de sustancias químicas a base de carbono, como el etanol y/o el ácido láctico que el alcanzado por cualquiera de las cepas.

10 En virtud de una nueva integración de las etapas de procesamiento, comúnmente conocida como bioprocesamiento consolidado (CBP), los aspectos de la presente invención proporcionan una producción más eficiente de un biocombustible y/u otro producto químico basado en carbono, como el ácido láctico de materias primas que contienen biomasa celulósica como la biomasa lignocelulósica de las plantas.

15 La incorporación de los microorganismos extremadamente termófilos en el procesamiento de la biomasa lignocelulósica permite que las etapas de fermentación se lleven a cabo a temperaturas más altas, mejorando así la economía del proceso. Por ejemplo, la cinética de reacción es típicamente una función de la temperatura, por lo que las temperaturas más altas se asocian generalmente con aumentos en la tasa de producción global. Además, las temperaturas más altas facilitan la eliminación de los productos volátiles del caldo, y reducen la necesidad de enfriamiento del sustrato después del pretratamiento (un paso precedente que se lleva a cabo típicamente a una temperatura elevada). El funcionamiento de los procesos CBP a temperaturas termófilas ofrece varios beneficios importantes respecto a las temperaturas de fermentación mesofílicas convencionales de 30-37°C. En particular, los costes asociados con una etapa de proceso dedicada a la producción de celulasa se eliminan para el CBP. También se espera que los costos asociados con el enfriamiento del fermentador y el intercambio de calor antes y después de la fermentación se reduzcan para el CBP. Además, los procesos que presentan biocatalizadores termofílicos pueden ser menos susceptibles a la contaminación microbiana en comparación con los procesos que presentan biocatalizadores mesofílicos convencionales.

25 En una realización, la presente invención proporciona un método para convertir maderas duras pretratadas por autohidrólisis a etanol por fermentación con un co-cultivo de un primer microorganismo celulolítico anaeróbico y de un segundo microorganismo sacarolítico anaeróbico, sin el uso de enzimas exógenas.

30 La aplicación de la tecnología actual tiene el potencial de hacer más económicamente viable la producción de productos químicos basados en carbono y biocombustibles y permitir que una gama más amplia de microorganismos utilice biomasa lignocelulósica. El uso de materiales celulósicos como fuentes de bioenergía está actualmente limitado por requerir típicamente el preprocesamiento del material celulósico. Dichos procedimientos 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 reto en la conversión de la biomasa en productos de fermentación es la recalcitrancia y heterogeneidad del material biológico.

35 Los presentes inventores han encontrado que los microorganismos del género *Caldicellulosiruptor* en combinación con microorganismos del género *Thermoanaerobacter* muestran una variedad de propiedades ventajosas para el uso en la conversión de material de biomasa lignocelulósica en biocarburantes y/o productos químicos basados en carbono, preferiblemente en ácido láctico, en un proceso de una sola etapa como parte de un sistema de bioprocesamiento consolidado (CBP).

40 La combinación específica de los microorganismos anteriormente mencionados en los métodos de producción de acuerdo con la presente descripción ofrece beneficios relacionados con:

a) Altas temperaturas de crecimiento y proceso, resultantes p. ej., en un menor riesgo de contaminación en el proceso de producción y, p. ej., el etanol, como producto de producción, puede destilarse simultáneamente durante el proceso de fermentación

45 b) Alta tolerancia al etanol (tolerancia de aproximadamente 4% de etanol y más)

c) Alta tolerancia al inhibidor

d) Amplia especificidad del sustrato y capacidad de utilizar pentosas, tales como xilosa y arabinosa y de hexosas tales como glucosa, manosa, fructosa y galactosa, así como celulosa y xilano

e) Relación mejorada de etanol:lactato:acetato

50 Es una ventaja de la combinación de los dos microorganismos diferentes que en el co-cultivo estos microorganismos sean capaces de convertir polisacáridos altamente complejos, como la celulosa y/o el xilano, con mayor eficiencia y mejores rendimientos de productos químicos basados en carbono, como el etanol o el ácido láctico, respecto al microorganismo solo.

En particular, estos microorganismos son extremadamente termófilos y muestran una amplia especificidad de sustrato y una alta producción natural de etanol y/o ácido láctico. Como se ha mencionado anteriormente, la fermentación química a base de carbono a altas temperaturas, por ejemplo a más de 70°C, tiene muchas ventajas respecto a la fermentación mesofílica. Una ventaja de la fermentación termofílica es la minimización del problema de contaminación en cultivos continuos, ya que sólo unos pocos microorganismos son capaces de crecer a tales altas temperaturas en materiales de biomasa de lignocelulosa no destoxificada.

También es una ventaja que los cultivos microbianos que comprenden microorganismos del género *Caldicellulosiruptor* y los microorganismos del género *Thermoanaerobacter* crezcan en el material de biomasa lignocelulósica pretratado así como en el no tratado. Estos cultivos microbianos son además capaces de crecer y producir productos de fermentación en concentraciones muy altas de materia seca del material de biomasa lignocelulósica.

Los cultivos microbianos de acuerdo con la presente descripción tienen una amplia especificidad de sustrato y son capaces de utilizar pentosas, tales como xilosa y arabinosa, y hexosas, tales como glucosa, manosa, fructosa y galactosa, así como utilizar celulosa y xilano. Los cultivos microbianos tienen además la ventaja de ser extremadamente termofílicos y, por lo tanto, son capaces de crecer a temperaturas muy elevadas dando como resultado elevadas productividades y tasas de conversión de sustrato, bajo riesgo de contaminación y recuperación facilitada del producto.

Además, los presentes inventores han encontrado que el uso de la combinación del primer y el segundo microorganismo, p. ej. en un co-cultivo microbiano, tiene una variedad de propiedades ventajosas en la conversión de polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos y/o monosacáridos de hexosas y pentosas, en particular las derivadas de hidrolizados lignocelulósicos, a alto nivel de etanol y/o ácido láctico, al tiempo que se producen bajos niveles de ácido acético. En particular, estos microorganismos son también termófilos extremos y muestran una amplia especificidad de sustrato y alta producción natural de etanol, así como de ácido láctico.

También es una ventaja que los cultivos microbianos que comprenden microorganismos extremadamente termófilos del género *Caldicellulosiruptor* y microorganismos extremadamente termófilos del género *Thermoanaerobacter* crezcan en el material de biomasa lignocelulósica pretratado así como en el no tratado. Estos cultivos microbianos son además capaces de crecer y producir productos de fermentación en concentraciones muy altas de materia seca de material de biomasa lignocelulósica.

Se encontró sorprendentemente que los microorganismos de acuerdo con la presente descripción son capaces de crecer en un medio que comprende una biomasa lignocelulósica que tiene un contenido de materia seca de al menos 10 por ciento en peso/peso, tal como al menos 15 por ciento en peso/peso, incluyendo al menos 20 por ciento en peso/peso e incluso hasta por lo menos 25 por ciento en peso/peso.

Los microorganismos de acuerdo con la presente descripción también pueden crecer eficientemente en productos de hidrólisis de celulosa (por ejemplo, el disacárido celobiosa), hexosas derivadas de celulosa (por ejemplo, glucosa), pentosas derivadas de hemicelulosa (por ejemplo, xilosa) y álamo explotado por vapor. En particular, los principales productos cultivados en celobiosa, glucosa y xilosa pueden ser el etanol y los ácidos lácticos. Los principales productos cultivados en sustratos de biomasa pretratados fueron el etanol y el ácido láctico, por ejemplo, cuando los microorganismos se hicieron crecer sobre madera de álamo tratada con explosión de vapor, el rendimiento de etanol fue alto. Los microorganismos de acuerdo con la presente descripción también crecieron eficientemente en celobiosa.

Además, los microorganismos de acuerdo con la presente descripción crecieron eficientemente sobre los materiales solubles obtenidos después del tratamiento térmico de la biomasa lignocelulósica.

El material de biomasa lignocelulósica y los hidrolizados 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 de acuerdo con la presente descripción que son tolerantes a estos inhibidores.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a un método para producir un biocombustible, y/u otro compuesto químico a base de carbono, que comprende:

a) Proporcionar una biomasa lignocelulósica

b) Poner en contacto la biomasa lignocelulósica con un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor*, en el que el primer microorganismo convierte al menos una porción de la biomasa en mono-, di- y/o poli-sacáridos; y

c) Poner en contacto la biomasa lignocelulósica con un segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter*, en el que el segundo microorganismo convierte al menos una porción de los mono-, di- y/o poli-sacáridos en un biocombustible y/u otro producto a base de carbono.

En otra realización, se describe un método para la sacarificación y fermentación simultáneas de material celulósico de biomasa en biocombustible, tal como etanol u otros productos químicos. El método comprende tratar la biomasa en un recipiente cerrado con un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* bajo condiciones en las que el primer microorganismo produce enzimas celulolíticas y/o sacarolíticas suficientes para convertir sustancialmente la biomasa en monosacáridos, disacáridos, oligo- y/o poli-sacáridos e introducir un cultivo de un segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter*, en el que el segundo organismo es capaz de convertir sustancialmente los sacáridos en biocombustibles y/u otros productos químicos basados en carbono.

En particular, el primer microorganismo celulolítico anaeróbico tiene la capacidad de descomponer celulosa y hemicelulosa y metabolizar tanto azúcares de hexosa como de pentosa resultantes de la sacarificación de biomasa lignocelulósica. Mientras que los microorganismos anaeróbicos pueden sacarificar simultáneamente la biomasa lignocelulósica y transformar la gama completa de azúcares de hexosa y pentosa resultantes de la biomasa en combustibles y/o productos químicos, la velocidad a la que cada tipo de azúcar de hexosa o pentosa se convierte en combustibles y/o productos químicos variará. En consecuencia, algunos azúcares serán transformados por el biocatalizador anaeróbico en combustibles y/o productos químicos más rápidamente que otros. Por lo tanto, una realización de la presente descripción permite un tiempo de contacto suficiente entre el material lignocelulósico y el primer biocatalizador fermentador celulolítico anaeróbico para lograr una sacarificación sustancialmente completa, pero sólo una conversión parcial de azúcares a combustibles y/o productos. A continuación, se añade el segundo microorganismo sacarolítico anaeróbico a la biomasa lignocelulósica que comprende los azúcares.

En una realización, se añade un primer microorganismo anaeróbico capaz de hidrolizar celulosa, hemicelulosa o material lignocelulósico y producir azúcares principalmente convertibles a una porción de una biomasa, y se añade simultáneamente un segundo microorganismo anaeróbico capaz de convertir los azúcares en biocombustible y/u otro producto químico a una velocidad alta al material lignocelulósico o con un cambio de tiempo.

En otra realización, la presente descripción se refiere a un método para convertir la biomasa lignocelulósica en un biocombustible u otro producto basado en carbono, que comprende la etapa de poner en contacto la biomasa lignocelulósica con un primer y un segundo microorganismos anaerobios extremadamente termófilos durante un periodo de tiempo en una fase inicial temperatura y un pH inicial, produciendo de este modo una cantidad de un biocombustible y/u otros productos químicos basados en carbono.

Además, las realizaciones de la presente descripción se refieren a cultivos microbianos adecuados para convertir biomasa lignocelulósica en un biocombustible y/u otro compuesto químico a base de carbono que comprende un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* y un segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter*.

En algunas realizaciones, el material de biomasa puede someterse a pretratamiento mecánico, termoquímico, y/o bioquímico opcional antes de ser utilizado en un bioproceso para la producción de combustibles y otros productos químicos basados en carbono. Los procesos mecánicos pueden reducir el tamaño de partícula del material lignocelulósico de modo que se pueda manejar más convenientemente en el bioproceso y puede aumentar el área superficial de la materia prima para facilitar el contacto con productos químicos/bioquímicos/biocatalizadores. El material lignocelulósico también puede someterse a pretratamientos térmicos y/o químicos para hacer más accesibles los polímeros vegetales, pero debido a que varias realizaciones pueden incorporar múltiples etapas de tratamiento con lignocelulosa, puede ser posible usar condiciones de pretratamiento térmico más suaves y menos costosas.

Los procesos mecánicos incluyen, pero no se limitan a, procesos de lavado, remojo, molienda, reducción de tamaño, cribado, corte y clasificación de tamaños. Los procesos químicos incluyen, pero no se limitan a, blanqueo, oxidación, reducción, tratamiento ácido, tratamiento básico, tratamiento con sulfito, tratamiento con sulfito ácido, tratamiento básico con sulfito e hidrólisis. Los procesos térmicos incluyen, pero no se limitan a, esterilización, explosión de vapor, mantenimiento a temperaturas elevadas en presencia o ausencia de agua y congelación. Los procesos bioquímicos incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con enzimas y tratamiento con microorganismos. Varias enzimas que pueden utilizarse incluyen celulasas, amilasa, β -glucosidasa, xilanasas, gluconasa, y otras polisacaridasas, lisozima, lacasa y otras enzimas modificadoras de la lignina, lipoxigenasa, peroxidasa y otras enzimas oxidativas, proteasas y lipasas.

Uno o más de los procesos mecánicos, químicos, térmicos y bioquímicos pueden combinarse o utilizarse por separado. Dichos procedimientos combinados pueden incluir también los utilizados en la producción de papel, productos de celulosa, celulosa microcristalina y celulósicos y pueden incluir procesamiento de pulpa, fabricación de pasta kraft o tratamiento con sulfito ácido. La materia prima puede ser una corriente lateral o una corriente residual de una instalación que utilice uno o más de estos procesos sobre un material celulósico, hemicelulósico o lignocelulósico, tal como una planta de papel, una planta celulósica, una planta de procesamiento de algodón o una planta de celulosa microcristalina. La materia prima también puede incluir materiales de desecho que contienen celulosa.

El método de pretratamiento más utilizado es la hidrólisis ácida, en la que el material lignocelulósico se somete a un ácido tal como ácido sulfúrico o ácido sulfuroso, por lo que los polímeros de azúcar, celulosa y hemicelulosa, se

hidrolizan parcial o totalmente en sus monómeros de azúcares constituyentes. Otro tipo de hidrólisis de lignocelulosa es la explosión de vapor, un proceso que comprende calentar el material lignocelulósico mediante inyección de vapor a una temperatura de 175-230°C y subsiguiente liberación repentina de presión. Un tercer método es la oxidación en húmedo en la que el material se trata con oxígeno a 150-185°C. Otro tratamiento previo puede ser el hinchamiento químico de las fibras de celulosa en altas concentraciones de productos químicos apropiados o disolventes incluyendo, pero sin limitación, amoníaco, cal, sosa cáustica o ácido fosfórico.

Los pretratamientos pueden ser seguidos por hidrólisis enzimática para completar la liberación de monómeros de azúcar. Esta etapa de pretratamiento da como resultado 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 puede complementarse, en ciertas realizaciones, con un tratamiento que da como resultado una hidrólisis adicional de la celulosa y la hemicelulosa. El propósito de este tratamiento de hidrólisis adicional es hidrolizar el oligosacárido y posiblemente las especies de polisacáridos producidas durante la hidrólisis ácida, oxidación húmeda o explosión de 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 consigue típicamente por tratamiento con un ácido, tal como el tratamiento con ácido sulfúrico acuoso, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 100-150°C. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo típicamente por tratamiento con una o más enzimas carbohidrasas apropiadas tales como celulasas, glucosidasas y hemicelulasas, incluyendo las xilanasas.

En una realización ventajosa, las células aisladas, las cepas, los microorganismos, las composiciones y los cultivos microbianos convierten el material de biomasa lignocelulósica, que sólo se ha tratado mecánicamente, en productos químicos a base de biocombustible y/o carbono, preferiblemente en etanol y/o ácido láctico, preferiblemente en un proceso de una sola etapa de un sistema consolidado de bioprocusamiento (CBP).

En otras realizaciones ventajosas, la biomasa lignocelulósica es pretratada con trituración mecánica y un tratamiento subsiguiente con ácido sulfuroso o su anhídrido bajo calor y presión con una liberación repentina de presión. En realizaciones ventajosas, la biomasa lignocelulósica se muele antes de convertirla en biocombustibles y/o sustancias químicas a base de carbono, como el ácido láctico. En una realización, la biomasa lignocelulósica es biomasa pretratada de *Populus* spp, preferiblemente pretratada con explosión de vapor. En otra realización, la biomasa lignocelulósica es biomasa pretratada de *Miscanthus* spp, preferiblemente pretratada con explosión de vapor.

En algunas realizaciones, el microorganismo anaeróbico según la presente descripción puede fermentar la biomasa directamente sin la necesidad de un pretratamiento.

En algunas realizaciones, la biomasa lignocelulósica puede ser pretratada, tal como por medios térmicos, mecánicos y/o químicos. Dicho pretratamiento puede hidrolizar, al menos parcialmente, carbohidratos o proteínas presentes, alterar la estructura celular, aumentar el área superficial o hacer que los hidratos de carbono sean más accesibles a microorganismos o enzimas.

En algunas realizaciones, las etapas del procedimiento incluyen: 1) poner en contacto un material de biomasa pretratado en condiciones anaeróbicas con un primer microorganismo anaeróbico perteneciente al género de *Caldicellulosiruptor*, donde la bacteria es capaz de convertir al menos una parte de la biomasa en hidratos de carbono como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, alcoholes y/o ácido láctico, 2) poner en contacto la materia prima tratada resultante con un microorganismo sacarolítico anaeróbico perteneciente al género *Thermoanaerobacter* que es capaz de fermentar al menos una porción de los carbohidratos a combustibles y/u otros productos químicos, 3) separar el(los) producto(s) de fermentación, p. ej. por destilación.

Con los métodos, los microorganismos y/o los cultivos microbianos según la presente descripción se generan una serie de diferentes productos de fermentación, incluyendo ácidos, alcoholes, cetonas e hidrógeno. En una realización, el alcohol se selecciona del grupo que consiste en etanol, butanol, propanol, metanol, propanodiol y butanodiol. En una realización adicional, el ácido es un ácido orgánico como el ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico, ácido butírico o ácido fórmico y la cetona es la acetona. En realizaciones ventajosas, se produce un biocombustible, en particular etanol y/o ácido láctico.

Para producir un producto de fermentación, la biomasa lignocelulósica se pone en contacto con un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor*, en particular con una especie nueva del género *Caldicellulosiruptor* o una nueva subespecie de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. En una realización, los microorganismos *Caldicellulosiruptor* son celulolíticos y xilanolíticos.

Por ejemplo, el género *Caldicellulosiruptor* incluye diferentes especies de bacterias extremadamente termófilas (temperatura óptima para un crecimiento superior a 70°C) celulolíticas y hemicelulolíticas, estrictamente anaeróbicas, que no producen esporas. La primera bacteria de este género, *Caldicellulosiruptor saccharolyticum* la cepa Tp8T (DSM 8903) tiene una temperatura óptima de 70°C y se aisló a partir de una fuente termal en Nueva Zelanda (Rainey et al., 1994, Sissons et al., 1987). Hidroliza una variedad de carbohidratos 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).

En realizaciones ventajosas, el microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* se selecciona del grupo constituido por los microorganismos enumerados en la tabla 1.

5 **Tabla 1**

Género	Especies	Nombre	Número de acceso DSMZ	Fecha de depósito	SEQ ID NO. 16SrDNA
Caldicellulosiruptor	sp.	DIB004C	DSM 25177	15.09.2011	1
Caldicellulosiruptor	sp.	DIB041C	DSM 25771	15.03.2012	2
Caldicellulosiruptor	sp.	DIB087C	DSM25772	15.03.2012	3
Caldicellulosiruptor	sp.	DIB101C	DSM 25178	15.09.2011	4
Caldicellulosiruptor	sp.	DIB103C	DSM 25773	15.03.2012	5
Caldicellulosiruptor	sp.	DIB104C	DSM 25774	15.03.2012	6
Caldicellulosiruptor	sp.	DIB107C	DSM 25775	15.03.2012	7

10 Las cepas enumeradas en la tabla 1 se han depositado de conformidad con los términos del Tratado de Budapest sobre las fechas de depósito notificadas con DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, con los números de acceso DSMZ notificados anteriormente por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE).

En una realización ventajosa, el primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* comprende una secuencia de 16S rDNA 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 cualquier combinación de las mismas.

15 En una realización, el primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* comprende una secuencia de ADNr 16S de al menos 99, al menos 99,3, al menos 99,5, al menos 99,7, al menos 99,9, al menos 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 1. En otras realizaciones, el primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* comprende una secuencia de ADNr 16S al menos 99, al menos 99,3, al menos 99,5, al menos 99,7, al menos 99,9, al menos 99,99 por ciento idéntica a una secuencia seleccionada de la 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 y cualquier combinación de las mismas.

20 En otra realización, *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (número de acceso DSMZ 25177) y/o un *Caldicellulosiruptor* sp. de la cepa enumerada en la tabla 1, las células derivadas de allí, los mutantes de allí, progenies u homólogos se utilizan como el primer microorganismo en los métodos de producción de acuerdo con la presente descripción.

En una realización ventajosa, el primer microorganismo usado en los métodos de acuerdo con la presente descripción se refiere a un microorganismo que preferiblemente tiene una o más de las siguientes características:

- 25 a) es un microorganismo del género *Caldicellulosiruptor*;
- b) en un ensayo de hibridación ADN-ADN, muestra una relación ADN-ADN de al menos 70%, preferiblemente al menos 90%, al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99% con una *Caldicellulosiruptor* sp. cepas enumeradas en la tabla 1, respectivamente; y/o
- 30 c) muestra un nivel de similitud de secuencia del gen 16S rDNA de al menos 98%, preferiblemente al menos 99% al menos 99,5%, más preferiblemente 100% con una *Caldicellulosiruptor* sp. cepas enumeradas en la tabla 1, respectivamente; y/o
- d) es capaz de crecer en condiciones de alta temperatura por encima de 70°C, y/o
- e) es una bacteria Gram-positiva.

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

Los microorganismos *Caldicellulosiruptor* usados de acuerdo con la presente descripción tienen varias características altamente ventajosas necesarias para la conversión de material de biomasa lignocelulósica. De este modo, 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 será evidente a partir de los ejemplos siguientes, el examen de la secuencia completa de 16S rDNA mostró que las siete cepas de *Caldicellulosiruptor* sp. enumeradas en la tabla 1 pueden estar relacionados *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* aunque las secuencias de 16S rDNA claramente los colocan en una subespecie separada o incluso en una especie diferente.

En una realización preferida, el primer microorganismo usado en los métodos de acuerdo con la presente descripción es:

a) *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C, depositado el 15 de septiembre de 2011 bajo el número de acceso DSM 25177 de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en la 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 *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C o

c) un homólogo de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C.

En otra realización preferida, el primer microorganismo usado en los métodos de acuerdo con la presente descripción es:

a) Cualquier *Caldicellulosiruptor* sp. enumerado en la tabla 1, excepto *Caldicellulosiruptor* DIB004C, depositado bajo el respectivo número de acceso indicado en la tabla 1, según las exigencias del Tratado de Budapest en la 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 tales cepas de *Caldicellulosiruptor* sp. o

c) un homólogo de tal cepa *Caldicellulosiruptor* sp.

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

En realizaciones ventajosas, el segundo microorganismo es una especie nueva del género *Thermoanaerobacter*. Las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. de acuerdo con la presente descripción que se enumeran en la Tabla 2 son sacarolíticas (hexosas de fermento y pentosas a etanol, lactato y trazas de acetato). Cinco cepas enumeradas en la tabla 2 están relacionadas con *Thermoanaerobacter mathranii* y tres cepas están relacionados con *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*.

Por ejemplo, el género *Thermoanaerobacter* incluye diferentes especies extremadamente termófilas (óptimo de temperatura para el crecimiento superior a 70°C) y bacterias termofílicas hemicelulolíticas y sacarolíticas, estrictamente anaeróbicas (Lee et al., 1993). *Thermoanaerobacter mathranii* DSM 11426 es una bacteria extremadamente termófila. Tiene una temperatura óptima entre 70 y 75°C y se aisló de una fuente termal en Islandia (Larsen et al., 1997). Utiliza una serie de azúcares como fuentes de carbono, pero no utiliza celulosa microcristalina. Los productos finales de fermentación sobre xilosa fueron etanol, acetato, bajas cantidades de lactato, CO₂, y H₂ (Larsen et al., 1997). *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *finnii* es una bacteria sacarolítica termófila. Tiene una temperatura óptima entre 55 y 60°C y se aisló de un campo petrolífero a una profundidad de 2.100 m (Cayol et al., 1995). Utiliza una serie de azúcares como fuentes de carbono, pero no puede utilizar xilano o celulosa. Los productos finales de fermentación sobre glucosa fueron lactato, acetato, etanol, H₂, y CO₂ (Coyol et al., 1995).

En realizaciones ventajosas, el microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter* se selecciona del grupo constituido por los microorganismos enumerados en la tabla 2.

Tabla 2

Género	Especie	Nombre	Número de acceso DSMZ	Fecha de depósito	SEQ ID NO.16SrDNA
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB004G	DSM 25179	15.09.2011	8
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB087G	DSM 25777	15.03.2012	9
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB097X	DSM 25308	27.10.2011	10
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB101G	DSM 25180	15.09.2011	11
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB101X	DSM 25181	15.09.2011	12
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB103X	DSM 25776	15.03.2012	13
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB104X	DSM 25778	15.03.2012	14
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB107X	DSM 25779	15.03.2012	15

5 Las cepas enumeradas en la tabla 2 se han depositado de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest sobre las fechas de depósito notificadas con DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, con los números de acceso DSMZ notificados anteriormente por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia (DE).

10 En una realización, el segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter* comprende una secuencia de ADNr 16S al menos 99, al menos 99,3, al menos 99,5, al menos 99,7, al menos 99,9, al menos 99,99 por ciento idéntica a la SEQ ID NO 8. En otras realizaciones, el primer microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter* comprende una secuencia de ADNr 16S al menos 99, al menos 99,3, al menos 99,5, al menos 99,7, al menos 99,9, al menos 99,99 por ciento idéntica a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14 o SEQ ID NO 15, y cualquier combinación de los mismos.

15 En otras realizaciones, las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. enumeradas en la tabla 2, las células derivadas de ellas, los mutantes de ellas, las progenies u homólogos se utilizan como el segundo microorganismo en los métodos de producción de acuerdo con la presente descripción.

20 En una realización ventajosa, se utilizan *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSMZ número de acceso 25179) y/o *Thermoanaerobacter* sp. DIB101G (número de acceso DSMZ 25180), células derivadas de ésta, mutantes de ésta, progenies u homólogos como el segundo microorganismo en los métodos de producción de acuerdo con la presente descripción.

El segundo microorganismo puede ser *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G y/o cualquier cepa de *Thermoanaerobacter* listada en la tabla 2 que contiene secuencias de 16S rDNA 100 por ciento y/o 99,99 por ciento idénticas a cualquiera de las secuencias SEQ ID 8-SEQ ID 15, respectivamente.

25 En otras realizaciones, la biomasa lignocelulósica se pone en contacto y/o se trata con un segundo microorganismo que tiene una o más de las siguientes características:

a) es un microorganismo del género *Thermoanaerobacter*; y/o

30 b) en un ensayo de hibridación ADN-ADN, muestra una relación ADN-ADN de al menos 70%, preferiblemente al menos 90%, al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99% con cualquiera de las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. enumeradas en la tabla 2 con los números de adhesión y las fechas de depósito respectivamente indicados; y/o

c) muestra un nivel de similitud de secuencia del gen 16S rDNA de al menos 98%, preferiblemente al menos 99% o al menos 99,5%, más preferiblemente 100% con cualquiera de las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. enumeradas en la tabla 2 con los números de adhesión respectivamente indicados y las fechas de deposición, respectivamente; y/o

35 d) es capaz de crecer en condiciones de alta temperatura por encima de 70°C, y/o

e) 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 e).

5 En otra realización ventajosa, el segundo microorganismo usado en los métodos de acuerdo con la presente descripción es:

a) *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G, depositado el 15 de septiembre de 2011 bajo el número de acceso DSM 25179 de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia, Alemania (DE), o

10 b) un microorganismo derivado de *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G, o

c) un homólogo de *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G.

En otra realización ventajosa, el segundo microorganismo usado en los métodos de acuerdo con la presente descripción es:

15 a) cualquier cepa de *Thermoanaerobacter* sp., excepto *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G, que figuran en la tabla 2 con sus respectivas fechas de deposición y números de acceso depositados de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia, Alemania (DE), o

b) un microorganismo derivado de cualquiera de estas cepas de *Thermoanaerobacter* sp. o

20 c) un homólogo de cualquiera de estas cepas

Todas las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. enumeradas en la tabla 2 pertenecen al género *Thermoanaerobacter* y son bacterias extremadamente termófilas (crecimiento a temperaturas superiores a 70°C), sacarolíticas, estrictamente anaeróbicas y Gram-positivas. Las células son varillas rectas 0,3-0,4 µm por 2,0-6,0 µm, que aparecen tanto individualmente como en parejas. DIB004G y DIB101G crecen en varios azúcares como sustrato, incluyendo celobiosa, glucosa y xilosa. Los principales productos de fermentación de estos azúcares son el etanol y el lactato. También se forman trazas de acetato.

25 En una realización adicional, *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X depositado como DSM 25181 y/o *Thermoanaerobacter* sp. DIB97X depositado como DSM 25308, las células derivadas de ésta, los mutantes de ésta, progenies u homólogos se utilizan como el segundo microorganismo en los métodos de producción de acuerdo con la presente descripción.

30 Es una gran ventaja que *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X depositado como DSM 25181 y *Thermoanaerobacter* sp. DIB97X depositado como DSM 25308 sean xilanolíticos y sacarolíticos (fermentación de hemicelulosas, por ejemplo xilano, hexosas y pentosas a etanol, lactato y pequeñas cantidades de acetato).

35 La cepa DIB101X ha sido depositada de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest el 15 de septiembre de 2011 con DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, con el número de registro DSMZ DSM 25181 de DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia, Alemania (DE).

40 La cepa DIB97X ha sido depositada de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest el 27 de octubre de 2011 con DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, con el número de registro DSMZ DSM 25308 de DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia, Alemania (DE).

En otras realizaciones, la biomasa lignocelulósica se pone en contacto y/o se trata con un segundo microorganismo que tiene una o más de las siguientes características:

a) es un microorganismo del género *Thermoanaerobacter*; y/o

45 b) en un ensayo de hibridación ADN-ADN, muestra una relación ADN-ADN de al menos 70%, preferiblemente al menos 90%, al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99% con *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X o *Thermoanaerobacter* sp. DIB97X depositados como DSM 25181 o DSM 25308, respectivamente; y/o

50 c) muestra un nivel de similitud de secuencia del gen 16S rDNA de al menos 98%, preferiblemente al menos 99% o al menos 99,5%, más preferiblemente 100% con *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X o *Thermoanaerobacter* sp. DIB97X depositados como DSM 25181 o DSM 25308, respectivamente; y/o

d) es capaz de crecer en condiciones de alta temperatura por encima de 70°C, y/o

e) 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 e).

5 En otra realización ventajosa, el segundo microorganismo usado en los métodos de acuerdo con la presente descripción es:

10 d) *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X, depositado el 15 de septiembre de 2011 bajo el número de acceso DSM 25181 de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia, Alemania (DE), o

e) un microorganismo derivado de *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X, o

f) un homólogo de *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X.

En otra realización ventajosa, el segundo microorganismo usado en los métodos de acuerdo con la presente descripción es:

15 d) *Thermoanaerobacter* sp. DIB97X, depositado el 27 de octubre de 2011 bajo el número de acceso DSM 25308 de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia, Alemania (DE), o

e) un microorganismo derivado de *Thermoanaerobacter* sp. DIB97X o

20 f) un homólogo de *Thermoanaerobacter* sp. DIB97X.

25 *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X (DSM 25181) y DIB97X (DSM 25308) pertenecen al género *Thermoanaerobacter* y son bacterias extremadamente termófilas (crecimiento a temperaturas superiores a 70°C), xilanolíticas y sacarolíticas, estrictamente anaeróbicas, Gram-positivas. Las células son varillas rectas 0,3-0,4 µm por 2,0-6,0 µm, que aparecen tanto individualmente como en parejas. DIB101X y DIB97X crecen en varios azúcares como sustrato, incluyendo xilano, xilosa, celobiosa y glucosa. Los principales productos de fermentación de estos sustratos son el etanol y el lactato. También se forman pequeñas cantidades de acetato.

30 Como es evidente a partir de lo que sigue, se han depositado las cepas preferidas de la presente descripción. Por lo tanto, se pueden obtener otras células, cepas, bacterias, microorganismos y/o cultivos microbianos de la presente descripción mutando las cepas depositadas y seleccionando mutantes derivados que tienen características mejoradas. Las características deseables incluyen un mayor rango de azúcares que se pueden utilizar, una mayor velocidad de crecimiento, la capacidad para producir cantidades más altas de productos de fermentación tales como etanol y/o ácido láctico, etc. Métodos adecuados para la mutación de cepas bacterianas y para la selección de los mutantes deseados se describen en "Funcional Analysis of Bacterial Genes: A practical Manual", editado por W. Schumann, S. D. Ehrlich y N. Ogasawara, 2001.

35 En realizaciones ventajosas, los microorganismos pueden modificarse para obtener mutantes o derivados con características mejoradas. De este modo, en una realización se proporciona una cepa bacteriana de acuerdo con la descripción, en la que uno o más genes se han insertado, eliminado o sustancialmente inactivado. La variante o mutante es típicamente capaz de crecer en un medio que comprende un material de biomasa lignocelulósica.

40 En otra realización, se proporciona un procedimiento para preparar variantes o mutantes de los microorganismos de acuerdo con la presente descripción, en el que uno o más genes se insertan, se suprimen o se inactivan sustancialmente como se describe en el presente documento.

45 En algunas realizaciones, uno o más genes adicionales se insertan en un microorganismo de acuerdo con la presente descripción, en particular en el primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor*, en particular en *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (DSM 25177) y/u otra cepa de *Caldicellulosiruptor* sp. enumerada en la tabla 1. Por lo tanto, con el fin de mejorar el rendimiento del producto de fermentación específico, puede ser beneficioso insertar uno o más genes que codifican una polisacarasa en la cepa de acuerdo con la invención. Por lo tanto, en realizaciones específicas se proporciona una cepa y un procedimiento de acuerdo con la invención en el que 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 (tal 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), acetilesteasas (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 CE 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).

- 5 De acuerdo con la presente descripción, también se proporciona un método para producir un producto de fermentación que comprende cultivar una cepa de acuerdo con la invención en condiciones adecuadas.

Las cepas de acuerdo con 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 bajo condiciones estrictamente anaeróbicas. Además, los microorganismos de acuerdo con la descripción son microorganismos extremadamente termófilos, y por lo tanto el proceso puede funcionar óptimamente, cuando se hace funcionar a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 45-95 grados centígrados, tal como el intervalo de aproximadamente 50-90 grados centígrados, incluyendo el intervalo de aproximadamente 60-85 grados centígrados, tal como el intervalo de aproximadamente 65-75 grados centígrados. En una realización ventajosa la temperatura es de 70°C y superior.

- 15 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 célula inmovilizada, un reactor de lecho fluidizado o un biorreactor de membrana.

- 20 En una realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (número de acceso DSMZ 25177) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSM 25179) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (número de acceso DSMZ 25177) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB097X (DSM 25308) como el segundo microorganismo.

- 25 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB041C (número de acceso DSMZ 25771) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSM 25179) como el segundo microorganismo.

- 30 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB087C (número de acceso DSMZ 25772) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSM 25179) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB101C (número de acceso DSMZ 25178) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSM 25179) como el segundo microorganismo.

- 35 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB103C (número de acceso DSMZ 25773) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSM 25179) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB104C (número de acceso DSMZ 25774) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSM 25179) como el segundo microorganismo.

- 40 En una realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (número de acceso DSMZ 25177) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB087G (DSM 25777) como el segundo microorganismo.

- 45 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB041C (número de acceso DSMZ 25771) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB087G (DSM 25777) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB087C (número de acceso DSMZ 25772) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB087G (DSM 25777) como el segundo microorganismo.

- 50 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB101C (número de acceso DSMZ 25178) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB087G (DSM 25777) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB103C (número de acceso DSMZ 25773) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (DSM 25179) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB103C (número de acceso DSMZ 25773) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB104X (DSM 25778) como el segundo microorganismo.

5 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB104C (número de acceso DSMZ 25774) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB104X (DSM 25778) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB107C (DSMZ número de acceso 25775) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB104X (DSM 25778) como el segundo microorganismo.

10 En una realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (número de acceso DSMZ 25177) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (DSM 25779) como el segundo microorganismo.

15 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB041C (número de acceso DSMZ 25771) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (DSM 25779) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB087C (número de acceso DSMZ 25772) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (DSM 25779) como el segundo microorganismo.

20 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB101C (número de acceso DSMZ 25178) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (DSM 25779) como el segundo microorganismo.

En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB103C (número de acceso DSMZ 25773) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (DSM 25779) como el segundo microorganismo.

25 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB104C (número de acceso DSMZ 25774) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (DSM 25779) como el segundo microorganismo.

30 En otra realización ventajosa, el cultivo microbiano comprende *Caldicellulosiruptor* sp. DIB107C (DSMZ número de acceso 25775) como el primer microorganismo y *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (DSM 25779) como el segundo microorganismo.

35 En ciertas realizaciones, los microorganismos usados en los métodos de la presente descripción crecen y producen etanol de la manera más eficiente a una cierta temperatura inicial. Como se ha mencionado anteriormente, es una ventaja de los métodos de la presente descripción que la temperatura pueda ser alta, preferiblemente mayor que 65°C, más preferiblemente 70°C y superior hasta una temperatura máxima de 90°C, preferiblemente 80°C, más preferiblemente 75°C ya que los microorganismos usados son extremadamente termófilos. Esto da como resultado un menor riesgo de contaminación y tiempos de reacción más rápidos.

40 En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el periodo de tiempo es de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 300 horas. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el período de tiempo es de aproximadamente 50 horas a aproximadamente 200 horas. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el período de tiempo es de aproximadamente 80 horas a aproximadamente 160 horas. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el periodo de tiempo es de aproximadamente 80 horas (h), aproximadamente 85 h, aproximadamente 90 h, aproximadamente 95 h, aproximadamente 100 h, aproximadamente 105 h, aproximadamente 110 h, aproximadamente 115 h, aproximadamente 120 h, aproximadamente 125 h, aproximadamente 130 h, aproximadamente 135 h, aproximadamente 140 h, aproximadamente 145 h, aproximadamente 150 h, aproximadamente 155 h, o aproximadamente 160 h.

50 En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el período de tiempo es de aproximadamente 120 horas. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en los que la temperatura inicial es de aproximadamente 45°C a aproximadamente 80°C. En ciertas realizaciones, la invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en los que la temperatura inicial es de aproximadamente 65°C a aproximadamente 80°C. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en los que la temperatura inicial es de aproximadamente 70°C a aproximadamente 75°C. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en los que la temperatura inicial es de aproximadamente 72°C.

55

- En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH inicial está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH inicial está entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en donde el pH inicial es aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5 o aproximadamente 9. En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, en los que el pH inicial es de aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, o aproximadamente 8.
- Como se mencionó anteriormente, el co-cultivo microbiano usado para producir el producto de fermentación a partir de biomasa muestra varias características que los distinguen de los microorganismos actualmente utilizados: (i) alto rendimiento y baja inhibición del producto, (ii) utilización simultánea de biomasa lignocelulítica y/o azúcares, y (iii) crecimiento a temperaturas elevadas. Los microorganismos en el co-cultivo microbiano son organismos termófilos robustos con un menor riesgo de contaminación. Convierten eficientemente una gama extraordinariamente amplia de componentes de biomasa a productos químicos basados en carbono como el ácido láctico o el etanol.

El término "comprender", tal como se utiliza en este documento, además de su significado literal, incluye también y específicamente se refiere a las expresiones "consisten esencialmente en" y "consisten en". Por lo tanto, el término "comprender" se refiere a realizaciones en las que la materia-objeto que "comprende" elementos específicamente enumerados no comprende elementos adicionales así como realizaciones en las que la materia-objeto que "comprende" elementos específicamente enumerados puede y/o, de hecho, sí abarca otros elementos. Asimismo, el término "tienen" debe entenderse como el término "comprender", incluyendo también y específicamente las expresiones "consisten esencialmente en" y "consisten en".

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

Métodos y ejemplos

En los siguientes ejemplos, se proporcionan materiales y métodos de la presente descripción que incluyen la determinación de propiedades de las cepas de acuerdo con la presente descripción. Debe entenderse que estos ejemplos son sólo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos de esta descripción de ninguna manera.

Ejemplo 1: Aislamiento y Cultivo

Todos los procedimientos de enriquecimiento y aislamiento de cepas emplearon técnicas anaeróbicas para bacterias estrictamente anaeróbicas (Hungate, 1969). Las cepas fueron enriquecidas 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 rollo de Hungate (Hungate, 1969).

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

Medio básico		
NH ₄ Cl	1,0	g
NaCl	0,5	g
MgSO ₄ x 7H 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

ES 2 643 265 T3

Medio básico		
Celobiosa	5,0	g
Vitaminas (ver abajo)	1,0	ml
Elementos de seguimiento (ver más abajo)	0,5	ml
Resazurina	1,0	mg
Na ₂ S x 9H ₂ O	0,75	g
Agua desionizada	1000.0	ml
Solución madre de elementos traza		
NiCl ₂ x6H ₂ O	2	g
FeSO ₄ x7H ₂ O	1	g
Citrato de NH ₄ Fe (III), marrón, 21,5% de Fe	10	g
MnSO ₄ xH ₂ O	5	g
CoCl ₂ x6H ₂ O	1	g
ZnSO ₄ x7H ₂ O	1	g
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,1	g
H ₃ BO ₃	0,1	g
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,1	g
Na ₂ SeO ₃ x5H ₂ O	0,2	g
Na ₂ WO ₄ x2H ₂ O	0,1	g
Agua destilada	1000.0	ml
Añadir 0,5 ml de la solución madre de oligoelementos a 1 litro del medio		
Solución madre de vitaminas		
ácido nicotínico	200	mg
cianocobalamina	25	mg
Ácido p-aminobenzoico (ácido 4-aminobenzoico)	25	mg
D-pantotenato de calcio	25	mg
tiamina-HCl	25	mg
Riboflavina	25	mg

Solución madre de vitaminas		
ácido lipoico	25	mg
ácido fólico	10	mg
Biotina	10	mg
piridoxina-HCl	10	mg
Agua destilada	200.0	ml
Añadir 1 ml de la solución madre de vitaminas a 1 litro del medio		

5 Todos los ingredientes excepto el sulfuro se disuelven en agua desionizada y el medio se limpia con nitrógeno gaseoso (pureza 99,999%) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de sulfuro, el valor de pH se ajusta a 7,0 a temperatura ambiente con HCl 1 M. A continuación, el medio se dispensa en matraces de suero de 100 ml en atmósfera de nitrógeno y los recipientes se sellan herméticamente. Después de someter a autoclave a 121°C durante 20 minutos, el valor del pH debe estar entre 6,8 y 7,0.

10 Los sustratos de glucosa, xilano, tratados con explosión de vapor y la celulosa microcristalina Avicel se añaden a los frascos de suero a una concentración de 10 g/l (peso en seco) antes del tratamiento en autoclave. Después del tratamiento en autoclave, los cultivos se inoculan mediante la inyección de un cultivo de siembra a través del septum de sellado y se incuban en un incubador a 72°C y 100 rpm durante el tiempo indicado. Los cultivos de semillas se cultivaron durante 48 h sobre celulosa microcristalina (cepas celulolíticas, p. ej., DIB004C, DIB101C), glucosa (cepas sacarolíticas, p. ej., DIB004G, DIB101G) o xilano (cepas sacarolíticas/xilanolíticas, p. ej., DIB97X, DIB101X).

Ejemplo 2: HPLC

15 Los azúcares y los productos de fermentación se cuantificaron por HPLC-RI utilizando un Via Hitachi LaChrom Elite (Hitachi corp.) equipado con un Rezex ROA Ácido Orgánico H+ (Phenomenex). Los analitos se separaron isocráticamente con H₂SO₄ 2,5 mM y a 65°C.

Ejemplo 3: Análisis filogenético de los genes 16S rDNA

20 Se aisló ADN genómico a partir de cultivos crecidos como se describió anteriormente y se amplificó mediante PCR 16SrDNA utilizando 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) como cebador directo y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) como cebador inverso. Los productos resultantes se secuenciaron y las secuencias se analizaron utilizando el software Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation). La base de datos NCBI se utilizó para procedimientos BLAST. Los análisis de genes filogenéticos 16S rRNA se realizaron por el método de unión de vecinos (Saitou y Nei, 1987) utilizando el programa Mega 4 (Tamura et al., 2007)

Ejemplo 4: Producción de etanol y lactato en diferentes sustratos

25 Se realizaron ensayos sobre crecimiento y fermentación de sustratos tratados con explosión de vapor DD-STEX, BP-STEX, SCB-STEX, CORNST-STEX, CORNPL-STEX, MISC-STEX, SORG-STEX, SPR-STEX y celulosa microcristalina Avicel por cultivo en matraces sellados de 100 ml con 30 ml del medio descrito en el Ejemplo 1. Las cepas DIB004C y DIB101C crecieron bien en todos estos sustratos incluyendo celulosa microcristalina. Las cepas DIB004G, DIB101G, DIB97X y DIB101X crecieron bien en todos los sustratos tratados con explosión de vapor, pero no pudieron crecer en celulosa microcristalina.

35 Todas las cepas se prepararon bien en medio que contenía 20 g/l (peso seco) de madera de álamo tratada con explosión de vapor SO₂ (2% PO-STEX) cuando se cultivaba en frascos sellados de 100 ml con 30 ml del medio descrito en el Ejemplo 1. La Figura 1 muestra los resultados de la formación del producto de las cepas *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (A), *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G (B) solos y en co-cultivo de ambas cepas (C) para diversos sustratos técnicos tratados con explosión de vapor. Para cada sustrato, se aplicaron 10 g/l de concentraciones en seco. Las abreviaturas para los sustratos individuales son DDGS-STEX: Granos de destilería secos y solubles, pretratados por explosión de vapor; BP-STEX: pulpa de remolacha, pretratada por explosión de vapor; SCB-STEX: bagazo de caña de azúcar, pretratado por explosión de vapor; CORNST-STEX: tallos de maíz pretratados por explosión de vapor; CORNPL-STEX: plantas de maíz entero incl. tallos, mazorca y grano, pretratados por explosión de vapor; MISC-STEX: plantas Miscanthus, pretratadas por explosión de vapor; SORG-STEX: planta integral de sorgo dulce, pretratado por explosión de vapor; SPR-STEX: madera de abeto, pretratada por explosión de vapor.

Los principales productos de fermentación fueron etanol, acetato y lactato. Como se indica claramente en la Figura 1 que muestra las concentraciones del producto después de 7 días de cultivo para (A) DIB004C, (B) DIB004G y (C) co-cultivo de ambas cepas, para todos los sustratos la concentración del producto aumenta significativamente en el co-cultivo comparado con ambas culturas individuales.

- 5 La Figura 2 muestra el cambio factorial en la formación general del producto entre el cultivo de DIB004C solo y el co-cultivo de DIB004C con DIB004G. Además de la figura 1, se muestra claramente que no sólo se incrementa la formación total del producto, sino que además la formación de etanol está aumentada de forma proporcional en comparación con ambos cultivos individuales.

Ejemplo 5: Experimentos en lotes de fermentador.

- 10 Experimentos en lotes con p. ej., DIB004C, así como con los co-cultivos de DIB004C y DIB004G se realizaron mediante cultivo en el medio descrito anteriormente con adición de madera de álamo de 20 g/l pretratada con "explosión de vapor de SO₂" que comprende calentar en presencia de ácido diluido seguido por liberación repentina de presión.

- 15 La temperatura se controla a 72°C y el valor de pH se controla a 6,5 ± 0,25 durante toda la fermentación. El fermentador se purga con nitrógeno para eliminar el exceso de oxígeno antes de añadir sulfuro de sodio como se ha descrito anteriormente.

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

- 20 Los resultados del análisis de HPLC como se describe en el ejemplo 2 muestran la producción paralela de etanol, ácido láctico y ácido acético siendo el etanol el producto predominante y siendo el acetato producido sólo en una proporción menor.

Los resultados de la formación del producto durante una fermentación de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C sobre madera de álamo pretratada se muestra en la Figura 3.

La Figura 4 muestra un enfoque de fermentación idéntico que aplica un co-cultivo de *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C y *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G.

- 25 La Figura 5 muestra una comparación directa entre la concentración total del producto (etanol + lactato + acetato) durante las dos etapas de fermentación. Se muestra claramente que la formación del producto durante la fermentación de ambas cepas es tanto más rápida como duradera durante un periodo de tiempo más largo. Esto es una clara indicación de un efecto sinérgico de los dos cultivos que conduce a un aumento general de la formación del producto. Una posible explicación de este efecto sinérgico sería que la cepa *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G consumiría especies de azúcar soluble más rápidamente que la cepa *Caldicellulosiruptor* que conduce a una mejora de la presión de las enzimas celulolíticas.
- 30

Ejemplo 6: Filogenia

- 35 La secuenciación de 16S rDNA de las cepas de *Caldicellulosiruptor* enumeradas en la tabla 1 reveló que todas estas cepas tenían (al menos) una copia de un operón 16S rDNA que estaba más estrechamente relacionado con la cepa de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* Tp8T (DSM 8903) en las bases de datos públicas disponibles (Figura 6).

- 40 La secuenciación de 16S rDNA de las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. enumeradas en la tabla 2 revelaron que las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. tenían (al menos) una copia de un operón 16S rDNA. Basado en las secuencias de 16S rRNA de las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G, DIB097X, DIB101X, DIB103X y DIB107X fueron las más estrechamente relacionadas con la cepa *Thermoanaerobacter mathranii* A3 (DSM 11426), mientras que las cepas *Thermoanaerobacter* sp. DIB087G, DIB101G y DIB104X estaban más estrechamente relacionadas con la cepa de *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* E100-69 (DSM 567). Los alineamientos se realizaron con ClustalW (Chenna et al., 2003) y el árbol filogenético fue construido por el método de unión de vecinos (Saitou y Nei 1987) usando el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

Lista de referencias adicionales:

- 45 Cayol JL, Ollivier B, Patel BKC, Ravot M, Magot M, Ageron E, Grimont PAD, García JL. (1995) Description of *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *lactiethylicus* subsp. nov., isolated from a deep subsurface french oil well, a proposal to reclassify *Thermoanaerobacter finni* as *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *finni* comb. nov., and an emended description of *Thermoanaerobacter brockii*. *Int J Syst Bacteriol* 45: 783-789.

- 50 Chenna R, Sugawara H, Koike T, López R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 13: 3497-3500.

Donnison AM, Brockelsby CM, Morgan HW, Daniel RM. (1989) The degradation of lignocellulosics by extremely thermophilic microorganisms. *Biotechnol Bioeng* 33: 1495-1499.

- Hungate RE. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En: Methods in Microbiology Eds. Norris JR y Ribbons DW. pp 118-132. Nueva York: Academic Press.
- Larsen L, Nielsen P, Ahring BK. (1997) *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland. Arch Microbiol 168: 114-119.
- 5 Lee Y-E, Jain MK, Lee c. Lowe SE, Zeikus JG (1993) Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: Description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp.nov.; Reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* EIO0-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb, nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb, nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb, nov., respectively; and
10 transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Int J Syst Bacteriol 43: 41-51.
- Rainey FA, Donnison AM, Janssen PH, Saul D, Rodrigo A, Bergquist PL, Daniel RM, Stackebrandt E, Morgan HW. (1994) Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. FEMS Microbiol Lett 120: 263-266.
- 15 Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425.
- Sissons CH, Sharrock KR, Daniel RM, Morgan HW. (1987) Isolation of cellulolytic anaerobic extreme thermophiles from New Zealand thermal sites. Appl Environ Microbiol. 53: 832-838.
- Tamura K, Dudley J., Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596-1599.
- 20 Patente estadounidense US 6.555.350
- Solicitud de patente internacional WO 2007/134607
- Solicitud de patente internacional WO 2010/075213
- Solicitud de patente internacional WO 2009/108908

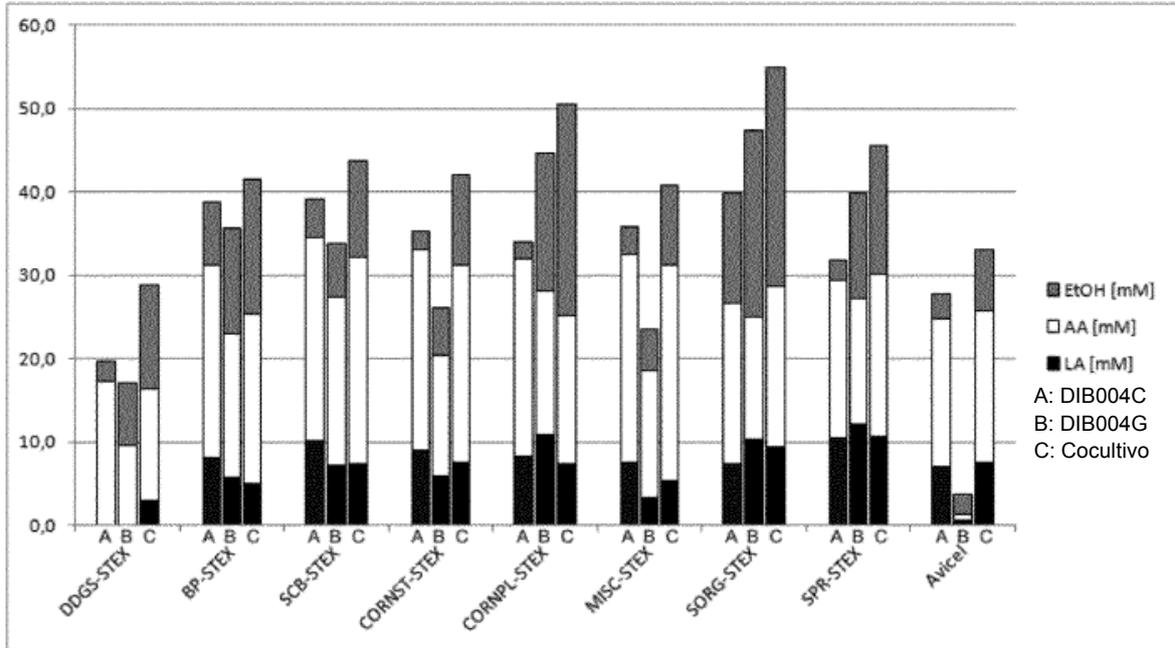
REIVINDICACIONES

1. Un cultivo microbiano aislado adecuado para convertir biomasa lignocelulósica en un biocombustible y/u otro compuesto químico a base de carbono que comprende un primer microorganismo perteneciente al género *Caldicellulosiruptor* y un segundo microorganismo perteneciente al género *Thermoanaerobacter*, en donde:
- 5 a) el primer microorganismo se selecciona del grupo que consiste en DIB004C depositado como DSM 25177, DIB101C depositado como DSM 25178, DIB041C depositado como DSM 25771, DIB107C depositado como DSM25772, DIB101C depositado como DSM 25178, DIB103C depositado como DSM 25773, DIB104C depositado como DSM 25774 y DIB107C depositados como DSM 25775, y en donde:
- 10 b) el segundo microorganismo se selecciona del grupo que consiste en DIB004G depositado como DSM 25179, DIB101G depositado como DSM 25180, DIB101X depositado como DSM 25181, DIB097C depositado como DSM 25308, DIB087G depositado como DSM 25777, DIB103X depositado como DSM 25776, DIB104X depositado como DSM 25778 y DIB107X depositados como DSM 25779.
2. El cultivo microbiano según la reivindicación 1, en el que la biomasa lignocelulósica se pone en contacto simultáneamente con dichos primer y segundo microorganismos o la biomasa lignocelulósica se pone en contacto con dichos primer y segundo microorganismos con un cambio de tiempo.
- 15 3. El cultivo microbiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la biomasa lignocelulósica se pone en contacto con dicho primer y segundo microorganismo en un co-cultivo.
4. Un método para convertir biomasa lignocelulósica en un biocombustible y/u otro producto a base de carbono, que comprende la etapa de poner en contacto la biomasa lignocelulósica con un co-cultivo microbiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 durante un periodo de tiempo a una temperatura inicial y un pH inicial, produciendo de ese modo una cantidad de un biocombustible y/u otros productos químicos basados en carbono.
- 20 5. El método según la reivindicación 4, en el que el periodo de tiempo es de 10 h a 300 h, preferiblemente de 50 h a 200 h, de 80 h a 160 h.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la temperatura inicial está en el intervalo entre 55°C y 80°C, preferiblemente entre 72°C y 78°C.
- 25 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pH inicial está entre 5 y 9, preferiblemente entre 6 y 8.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el biocombustible es un alcohol, preferiblemente etanol.
- 30 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto a base de carbono es un ácido carboxílico, preferiblemente ácido láctico o una sal o éster del mismo.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la biomasa lignocelulósica se selecciona del grupo que consiste en pasto, brotes de hierba, hierba de centeno, hierba de canario de caña, pasto mixto de pradera, miscantus, residuos de azúcar, bagazo de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, residuos de la agricultura, paja de arroz, cáscara de arroz, paja de cebada, mazorcas de maíz, paja de cereales, paja de trigo, paja de canola, paja de avena, cascarones de avena, fibra de maíz, hojarasca, hojarasca de soja, hojarasca de maíz, desechos forestales, fibra de pulpa de madera, lodo de papel, aserrín, madera dura, madera blanda, prensado de la remolacha azucarera, tallo de algodón, hojas de plátano, residuos de la producción de aceite vegetal y material de biomasa lignocelulósica obtenido mediante el procesamiento de plantas alimenticias.
- 35 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha biomasa lignocelulósica es una biomasa lignocelulósica pretratada derivada de un pretratamiento mecánico, termoquímico y/o bioquímico.
12. El método según la reivindicación 11, en el que el pretratamiento del material de biomasa lignocelulósica comprende exponer la biomasa lignocelulósica al tratamiento con vapor.
- 45 13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que pretratar el material de biomasa lignocelulósica comprende exponer la biomasa lignocelulósica a tratamiento con vapor y tratamiento enzimático, preferiblemente con enzimas que degradan la celulosa y/o la hemicelulosa.
14. El método según la reivindicación 11, en el que el pretratamiento del material de biomasa lignocelulósica comprende la trituración mecánica y un tratamiento subsiguiente con ácido sulfúrico, ácido sulfuroso o los respectivos anhídridos bajo calor y presión, con o sin liberación repentina de presión.
- 50 15. El método según la reivindicación 11, en el que el pretratamiento del material de biomasa lignocelulósica comprende la trituración mecánica y un tratamiento posterior con hidróxido de amoníaco, hidróxido de sodio,

ES 2 643 265 T3

hidróxido de potasio o hidróxido de calcio o, en la medida de lo posible, sus respectivos anhídridos, bajo calor y presión, con o sin una liberación repentina de presión.

FIGURA 1



DDGS: granos secos destiladores y solubles; BP: pulpa de remolacha; SCB: bagazo de azúcar de caña; CORNST: tallos de maíz; CORNPL: plantas de maíz; MISC: pastos miscanthus; SORG: melaza de sorgo; SPR: madera de abeto; STEX: pretratamiento de explosión por vapor

FIGURA 2

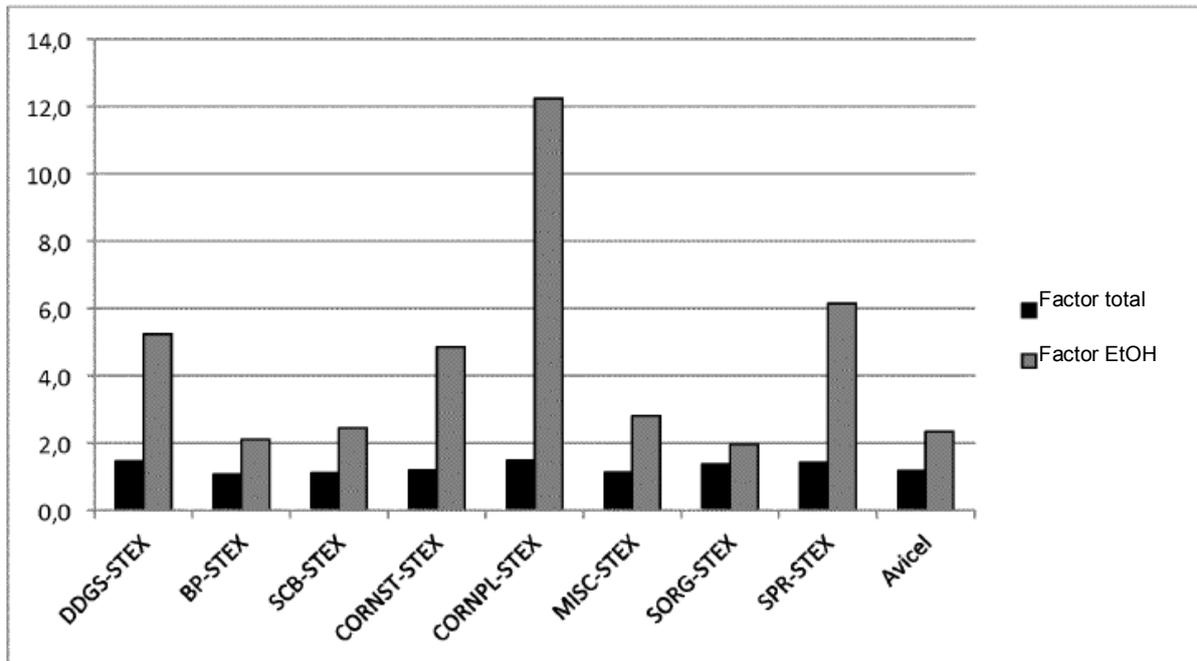


FIGURA 3

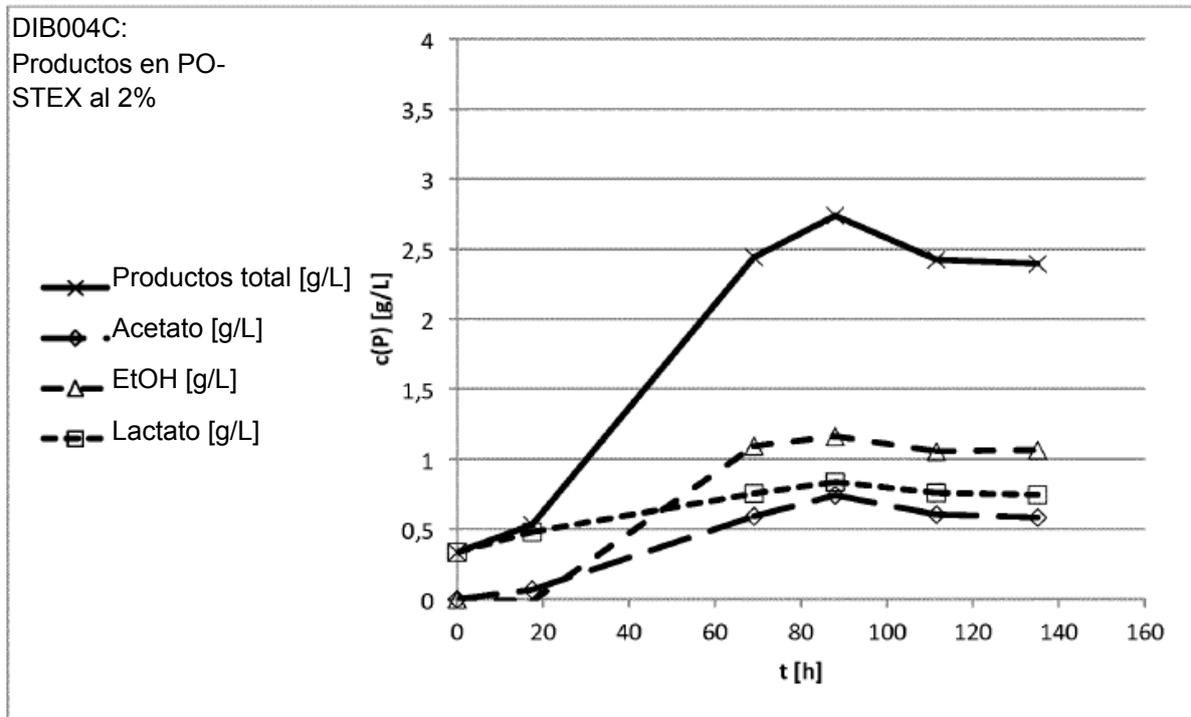


FIGURA 4

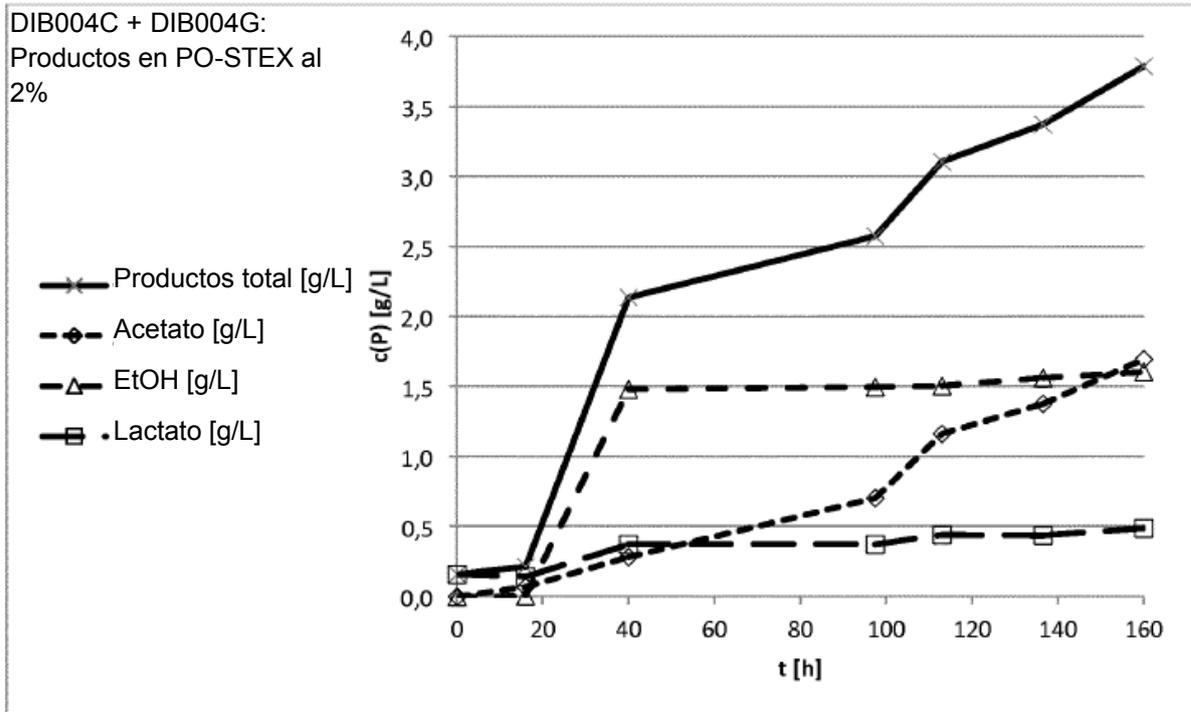


FIGURA 5

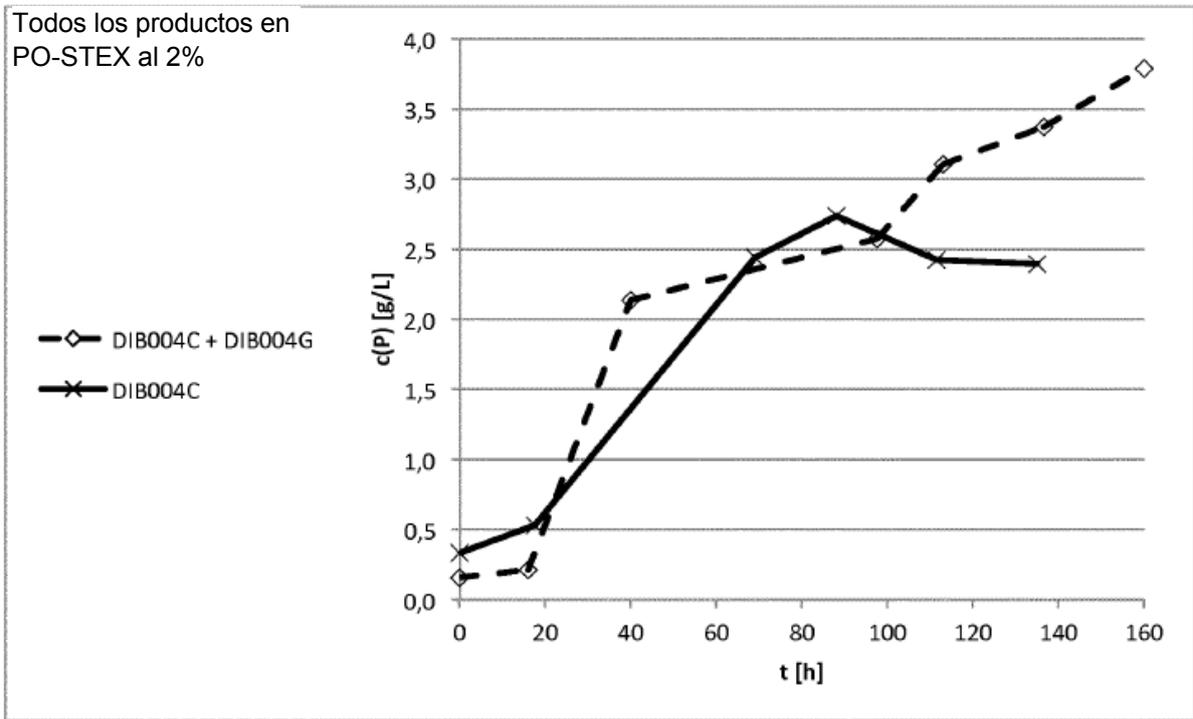


FIGURA 6

Árbol de unión de vecinos basado en las comparaciones de la secuencia del gen de 16S rRNA de cepas de *Caldicellulosiruptor* sp. y bacterias seleccionadas

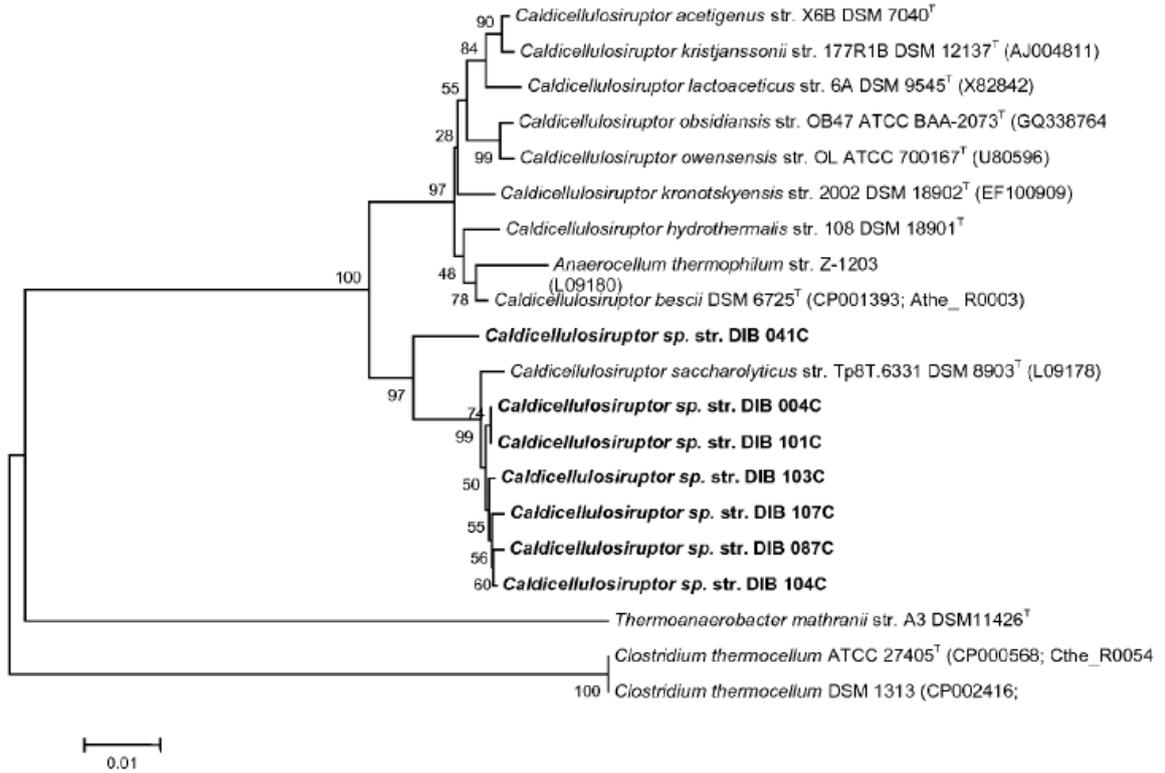


FIGURA 7

Árbol de unión de vecinos basado en las comparaciones de la secuencia del gen de 16S rRNA de cepas de *Thermoanaerobacter* sp. y bacterias seleccionadas

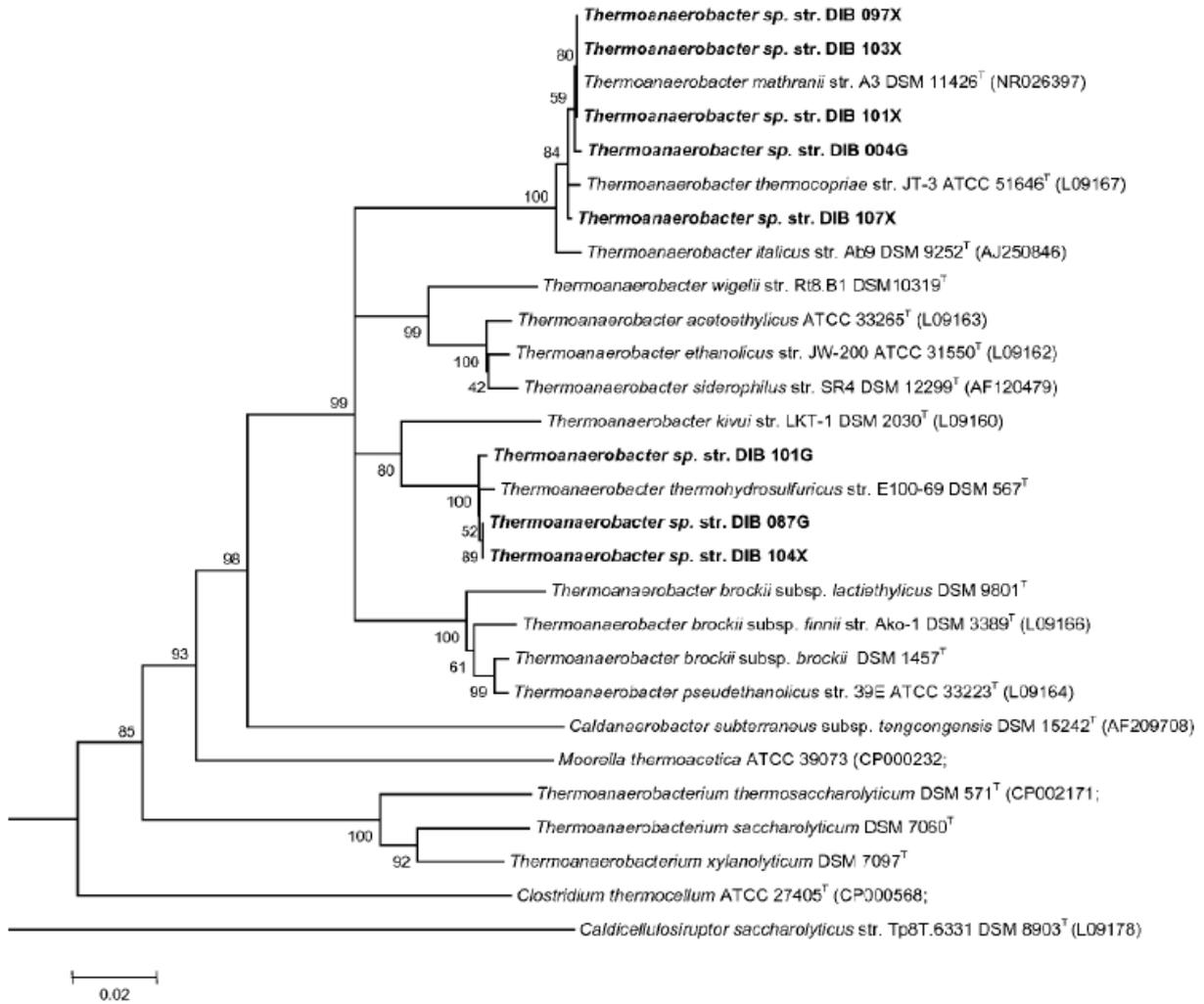


FIGURA 8

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Caldicellulosiruptor* sp. DIB004C (SEQ ID NO. 1)

TTACGACTTC	ACCCCAATCA	TCAGCCCCAC	CTTCAACACA	GCTTAACCTG	TGTCTTCAGG	60
TGTTGCTGAC	TCTCATGGTG	TGACGGGCGG	TGTGTACAAG	GCCCGGGAAC	GTATTACCCG	120
CGGCATGCTG	ATCCGCGATT	ACTAGCGATT	CCGACTTCAT	GCAGGCGAGT	TGCAGCCTGC	180
AATCCGAACT	GGGGGTGCTT	TTTTGGGATT	CGCTCCGGCT	CGCGCCTTCG	CACGCCCTCT	240
GTAGCACCCA	TTGTAGCACG	TGTGTAGCCC	AGGGCATAAG	GGGCATGATG	ATTTGACGTC	300
ATCCCCACCT	TCCTCCGCCT	CATCGACGGC	AGTCCOCTTA	GAGTGCCAC	CATTACGCGC	360
TGGCAACTAA	GGCAGGGGT	TGCGCTCGTT	GCGGGACTTA	ACCCAACATC	TCACGACACG	420
AGCTGACGAC	AACCATGCAC	CACCTGTGTC	CGGGCTCCTG	CTCTCATCGA	ACAGGCACCC	480
CACCCTTTCG	GGCAGGTCCC	CGGCATGTCA	AGCCCTGGTA	AGGTTCTTCG	CGTTGCTTCG	540
AATTAACCA	CATGCTCCAC	CGCTTGTGCG	GGCCCCGTC	AATTCCTTTG	AGTTTCAACC	600
TTGCGGCCGT	ACTCCCCAGG	CGGGATGCTT	ATTGTGTTAA	CTACGGCACG	GAGGAGTCCT	660
TCTCCCCCAC	ACCTAGCATC	CATCGTTTAC	AGCGTGGACT	ACCAGGGTAT	CTAATCCTGT	720
TCGCTCCCCA	CGCTTTCGTG	CCTCAGCGTC	AGTTACGGTC	CAGACGGCCG	CCTTCGCCAC	780
TGGTGTTCCT	CCGATATCT	ACGCATTTCA	CCGCTACACC	GGGAATTCCG	CCGTCCTCTC	840
CCGCACTCAA	GCTATGCAGT	ATTAAGCGCA	ATCCTTAGGT	TGAGCCTAAG	GCTTTCACGC	900
TTAACTCGCA	TAGCCGCCTA	CGCACCCCTT	ACGCCCAGTA	ATTCCGGACA	ACGCTCGCCA	960
CCTACGTATT	ACCGCGGCTG	CTGGCACGTA	GTTAGCGGTG	GCTTTTAAA	CGGGTACTAT	1020
CTCCTACTTC	TCCCCGTCCA	AAGAGGTTTA	CACCCCGAAG	GGCTTCTTCC	CTCACGCGGC	1080
GTCGCTGCGT	CAGGCTTCGG	CCCATTGCGC	AAGATTCCCC	GCTGCTGCCT	CCCCTAGGAG	1140
TGTGGGCCGT	GTCTCAGTCC	CACTGTGGCC	GTACACCCTC	TCAGGCCGGC	TACCCGTCGT	1200
CGCCTTGFTA	GGCCGTTACC	CCACCAACTA	GCTGATGGGC	CGCGAGCCCA	TCCCCAGCCA	1260
GTATAGCCTC	CCCGCTACC	CTTTCACCAC	ATCACCATGC	GATGACGTGG	TCCCATCGGG	1320
TATTAGCAGC	CCFTTCGAGC	TGTTATCCCC	GTGCTGGGGG	TAGGTTGCTC	ACGTGTTACT	1380
CACCCGTCCG	CGCTA					1396

FIGURA 9

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Caldicellulosiruptor* sp. DIB041C (SEQ ID NO. 2)

CTCAGGACGA	ACGCTGGCGG	CGTGCCTAAC	GCATGCAAGT	CGAGCGGAGG	TAGCCATGAA	60
GGTGAAGAGC	TGGAGTGGCT	ATCTTAGCGG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	GAGCAACCTA	120
CCCTCAGCAC	GGGGATAACA	GCTCGAAAGG	GCTGCTAATA	CCCGATGGGA	CCACGGCATC	180
GCATGATGTT	GTGGTGAAAG	GGTAGCCGTG	GAGGCTATAC	CGGCTGGGGA	TGGGCTCGCG	240
GCCCATCAGC	TAGTPTGGTG	GGTAAACGGCC	TACCAAGGCT	ACGACGGGTA	GCCGGCCTGA	300
GAGGGTGGTC	GGCCACAGTG	GGACTGAGAC	ACGGCCACACA	CTCCTACGGG	AGGCAGCAGC	360
GGGGAATCTT	GCGCAATGGG	CGAAAGCCTG	ACGCAGCGAC	GCCGCGTGAG	GGAGGAAGCC	420
CTTCGGGGTG	TAAACCTCTT	TGGACGGGGA	GAAGGAGGAG	ATAGTACCCG	TTTAAAAAGC	480
CACGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	TGGCGAGCGT	TGTCCGGAAT	540
TACTGGGCGT	AAAGGGTGCG	TAGGCGGCTA	TGCAAGTTAA	GCGTGAAATC	TTGGGGCTCA	600
ACCCCAAGGC	TGCGCTTAAT	ACTGCATAGC	TTGAGTGCGG	GAGAGGACGG	CGGAATTCCC	660
GGTGTAGCGG	TGAAATGCGT	AGATATCGGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG	CGGCCGTCTG	720
GACCGTAACT	GACGCTGAGG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCGA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	780
AGTCCACGCT	GTAACCGATG	GATGCTAGGT	GTGGGGGAGA	AGGACTCCTC	CGTGCCGTAG	840
TTAACACAAT	AAGCATCCCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA	GTTTGAAACT	CAAAGGAATT	900
GACGGGGGCC	CGCACAAAGC	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	CGAAGCAACG	CGAAGAACCT	960
TACCAGGGCT	TGACATGCCG	GGAACCTGCC	CGAAAGGGTG	GGGTGCCTGC	GCGATGAGTG	1020
CAGGAGCCCG	GACACAGGTG	GTGCATGGTT	GTGCTCAGCT	CGTGTCTGTA	GATGTTGGGT	1080
TAAGTCCCGC	AACGAGCGCA	ACCCCTGCCC	TTAGTTGCCA	GCACGTAATG	GTGGGCACTC	1140
TAAGGGGACT	GCCGCCGATG	AGGCGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAAT	CATCATGCCC	1200
CTTATGCCCT	GGGTACACA	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			1580

FIGURA 10

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Caldicellulosiruptor* sp. DIB087C (SEQ ID NO. 3)

TCAGGACGAA	CGCTGGCGGC	GTGCCTAACG	CATGCAAGTC	GAGCGGAGAT	GGTGGTTGAA	60
GGTGATGAGC	TGGAGGCTGC	CATCTTAGCG	GCGGACGGGT	GAGTAACACG	TGAGCAACCT	120
ACCCCCAGCA	CGGGGATAAC	AGCTCGAAAG	GGCTGCTAAT	ACCCGATGGG	ACCACGTCAT	180
CGCATGGTGA	TGTGGTGAAA	GGGTAGCCGG	GGAGGCTATA	CTGGCTGGGG	ATGGGCTCGC	240
GGCCCATCAG	CTAGTTGGTG	GGGTAACGGC	TCACCAAGGC	GACGACGGGT	AGCCGGCCTG	300
AGAGGGTGTA	CGGCCACAGT	GGGACTGAGA	CACGGCCAC	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	360
CGGGGAATCT	TGCGCAATGG	GCGGAAGCCT	GACGCGCGA	CGCCGCGTGA	GGGAAGAAGC	420
CCTTCGGGGT	GTA AACCTCT	TTGACCGGGG	AGAAGTAGGA	GATAGTACCC	GTTTAAAAAG	480
CCACGGCTAA	CTACGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATACGTAG	GTGGCGAGCG	TTGTCCGGAA	540
TTACTGGGCG	TAAAGGGTGC	GTAGGCGGCT	ATGCGAGTTA	AGCGTGAAAG	CCTTAGGCTC	600
AACCTAAGGA	TTGCGCTTAA	TACTGCATAG	CTTGAGTGCG	GGAGAGGACG	GCGGAATTCC	660
CGGTGTAGCG	GTGAAATGCG	TAGATATCGG	GAGGAACACC	AGTGCCGAAG	GCGGCCGTCT	720
GGACCGTAAC	TGACGCTGAG	GCACGAAAGC	GTGGGGAGCG	AACAGGATTA	GATACCCTGG	780
TAGTCCACGC	TGTA AACGAT	GGATGCTAGG	TGTGGGGGAG	AAGGACTCTT	CCGTGCCGTA	840
GTTAACACAA	TAAGCATCCC	GCCTGGGGAG	TACGGCCGCA	AGGTTGAAAC	TCAAAGGAAT	900
TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT	GTGGTTTAAT	TCGAAGCAAC	GCGAAGAACC	960
TTACCAGGGC	TTGACATGCC	GGGGACCTGC	CCGAAAGGGT	GGGGTGCTG	TTCGATGAGA	1020
GCAGGAACCC	GGACACAGGT	GGTGCATGGT	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	1080
TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC	AACCCCTGCC	CTTAGTTGCC	AGCGGGTAAT	GGTGGGCACT	1140
CTAAGGGGAC	TGCCGTGCAT	GAGGCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAA	TCATCATGCC	1200
CCTTATGCC	TGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGGTGCTA	CAGAGGGCGT	GCGAAGGCGC	1260
GAGCCGGAGC	GAATCCCAAA	AAAGCACCCC	CAGTTCGGAT	TGCAGGCTGC	AACTCGCCTG	1320
CATGAAGTCG	GAATCGCTAG	TAATCGCGGA	TCAGCATGCC	GCGGTGAATA	CGTTCCCGGG	1380
CCTTGATAC	ACCGCCCGTC	ACACCATGAG	AGTCAGCAAC	ACCTGAAGAC	ACAGGTTAAG	1440
CTGTGTTGAA	GGTGGGGCTG	ATGATTGGGG	TGAAGTCGTA	A		1481

FIGURA 11

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Caldicellulosiruptor* sp. DIB101C (SEQ ID NO. 4)

CCTGTGTCTT	CAGGTGTTGC	TGACTCTCAT	GGTGTGACGG	GCGGTGTGTA	CAAGCCCCGG	60
GAACGTATTC	ACCGCGGCAT	GCTGATCCGC	GATTACTAGC	GATTCCGACT	TCATGCAGGC	120
GAGTTGCAGC	CTGCAATCCG	AACTGGGGGT	GCTTTTTTGG	GATTGCTCC	GGCTCGCGCC	180
TTGCAACGCC	CTCTGTAGCA	CCCATTGTAG	CACGTGTGTA	GCCCAGGGCA	TAAGGGGCAT	240
GATGATTGA	CGTCATCCCC	ACCTTCCTCC	GCCTCATCGA	CGGCAGTCCC	CTTAGAGTGC	300
CCACCATTAC	GCGCTGGCAA	CTAAGGGCAG	GGGTGCGCT	CGTTGCGGGA	CTTAACCCAA	360
CATCTCACGA	CACGAGCTGA	CGACAACCAT	GCACCACCTG	TGTCGGGGCT	CCTGCTCTCA	420
TCGAACAGGC	ACCCACCCCT	TTCGGGCAGG	TCCCCGGCAT	GTCAAGCCCT	GGTAAGGTTT	480
TTGCGGTTGC	TTCGAATTAA	ACCACATGCT	CCACCGCTTG	TGCGGGCCCC	CGTCAATTCC	540
TTTGAGTTTC	AACCTTGGCG	CCGTACTCCC	CAGGCGGGAT	GCTTATTGTG	TTAACTACGG	600
CACGGAGGAG	TCCTTCTCCC	CCACACCTAG	CATCCATCGT	TTACAGCGTG	GACTACCAGG	660
GTATCTAATC	CTGTTCGCTC	CCCACGCTTT	CGTGCCCTCAG	CGTCAGTTAC	GGTCCAGACG	720
GCCGCCTTCG	CCACTGGTGT	TCCTCCCGAT	ATCTACGCAT	TTCACCGCTA	CACCGGGAAT	780
TCCGCCGTCC	TCTCCCGCAC	TCAAGCTATG	CAGTATTAAG	CGCAATCCTT	AGGTTGAGCC	840
TAAGGCTTTC	ACGCTTAACT	CGCATAGCCG	CCTACGCACC	CTTTACGCCC	AGTAATTCCG	900
GACAACGCTC	GCCACCTACG	TATTACCGCG	GCTGCTGGCA	CGTAGTTAGC	CGTGGCTTTT	960
TAAACGGGTA	CTATCTCCTA	CTTCTCCCCG	TCCAAAGAGG	TTTACACCCC	GAAGGGCTTC	1020
TTCCCTCAGC	CGGCGTCGCT	GCGTCAGGCT	TCCGCCCAT	GCGCAAGATT	CCCCGCTGCT	1080
GCCTCCCGTA	GGAGTGTGGG	CCGTGTCTCA	GTCCCCTGT	GGCCGTACAC	CCTCTCAGGC	1140
CGGCTACCCG	TCGTGCGCTT	GGTAGGCCGT	TACCCACCA	ACTAGCTGAT	GGGCCGCGAG	1200
CCCATCCCCA	GC					1212

FIGURA 12

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Caldicellulosiruptor* sp. DIB103C (SEQ ID NO. 5)

CGACTTCACC	CCAATCATCA	GCCCCACCTT	CAACACAGCT	TAACCTGTGT	CTTCAGGTGT	60
TGCTGACTCT	CATGGTGTGA	CGGGCGGTGT	GTACAAGGCC	CGGGAACGTA	TTCACCGCGG	120
CATGCTGATC	CGCGATTACT	AGCGATTCCG	ACTTCATGCA	GGCGAGTTGC	AGCCTGCAAT	180
CCGAACTGGG	GGTGCITTTT	TGGGATTTCG	TCCGGCTCGC	GCCTTCGCAC	GCCCTCTGTA	240
GCACCCATTG	TAGCACGTGT	GTAGCCCAGG	GCATAAGGGG	CATGATGATT	TGACGTCATC	300
CCCACCTTCC	TCCGCCTCAT	CGACGGCAGT	CCCCTTAGAG	TGCCCCACCAT	TACGCGCTGG	360
CAACTAAGGG	CAGGGGTTGC	GCTCGTTGCG	GGACTTAACC	CAACATCTCA	CGACACGAGC	420
TGACGACAAC	CATGCACCAC	CTGTGTCCGG	GCTCCTGCTC	TCATCGAACA	GGCACCCCAC	480
CCTTTCGGGC	AGGTCCCCGG	CATGTCAAGC	CCTGTAAGG	TTCTTCGCGT	TGCTTCGAAT	540
TAAACCACAT	GCTCCACCGC	TTGTGCGGGC	CCCCGTCAAT	TCCTTTGAGT	TTCAACCTTG	600
CGGCCGTACT	CCCCAGGGGG	GATGCTTATT	GTGTAACTA	CGGCACGGAG	GAGTCCTTCT	660
CCCCCACACC	TAGCATCCAT	CGTTTACAGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	ATCCTGTTCC	720
TCCCCCACGC	TTTCGTGCCT	CAGCGTCAGT	TACGGTCCAG	ACGGCCGCCT	TCGCCACTGG	780
TGTTCCCTCC	GATATCTACG	CATTTACCG	CTACACGGG	AATTCGGCCG	TCCTCTCCCG	840
CACTCAAGCT	ATGCAGTATT	AAGCGCAATC	CTTAGGTTGA	GCCTAAGGCT	TTCACGCTTA	900
ACTCGCATAG	CCGCCTACGC	ACCCTTTACG	CCCAGTAATT	CCGGACAACG	CTCGCCACCT	960
ACGTATTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGTGGCT	TTTTAAACGG	GTA CTATCTC	1020
CTACTTCTCC	CCGTCCAAAG	AGGTTTACAC	CCCGAAGGGC	TTCTTCCCTC	ACGCGGCGTC	1080
GCTGCGTCAG	GCTTCCGCCC	ATTGCGCAAG	ATCCCCGCT	GCTGCCTCCC	GTAGGAGTGT	1140
GGGCCGTGTC	TCAGTCCCAC	TGTGGCCGTA	CACCCTCTCA	GGCCGGCTAC	CCGTCGTCCG	1200
CTTGGAAGC	CGTTACCCCA	CCAAC TAGCT	GATGGGCCGC	GAGCCCATCC	CCA	1253

FIGURA 13

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Caldicellulosiruptor* sp. DIB104C (SEQ ID NO. 6)

GACTTCACCC	CAATCATCAG	CCCCACCTTC	AACACAGCTT	AACCTGTGTC	TTCAGGTGTT	60
GCTGACTCTC	ATGGTGTGAC	GGGCGGTGTG	TACAAGGCC	GGGAACGTAT	TCACCGCGGC	120
ATGCTGATCC	GCGATTACTA	GCGATTCCGA	CTTCATGCAG	GCGAGTTGCA	GCCTGCAATC	180
CGAACTGGGG	GTGCTTTTTT	GGGATTGCGT	CCGGCTCGCG	CCTTCGCACG	CCCTCTGTAG	240
CACCCATTGT	AGCACGTGTG	TAGCCCAGGG	CATAAGGGGC	ATGATGATTT	GACGTCATCC	300
CCACCTTCCT	CCGCCTCATC	GACGGCAGTC	CCCTTAGAGT	GCCCACCATT	ACGCGCTGGC	360
AACTAAGGGC	AGGGGTTGCG	CTCGTTGCGG	GACTTAACCC	AACATCTCAC	GACACGAGCT	420
GACGACAACC	ATGCACCACC	TGTGTCCGGG	CTCCTGCTCT	CATCGAACAG	GCACCCACC	480
CTTTCGGGCA	GGTCCCCGGC	ATGTCAAGCC	CTGGTAAGGT	TCTTCGCGTT	GCTTCGAATT	540
AAACCACATG	CTCCACCBCCT	TGTGCGGGCC	CCCGTCAATT	CCTTTGAGTT	TCAACCTTGC	600
GGCCGTACTC	CCCAGGCGGG	ATGCTTATTG	TGTTAACTAC	GGCACGGAAG	AGTCCTTCTC	660
CCCCACACCT	AGCATCCATC	GTTTACAGCG	TGGACTACCA	GGGTATCTAA	TCCTGTTGCG	720
TCCCCACGCT	TTCGTGCCTC	AGCGTCAGTT	ACGGTCCAGA	CGGCCGCCCT	CGCCACTGGT	780
GTTCCTCCCG	ATATCTACGC	ATTTACCCGC	TACACCGGGA	ATTCGCGCGT	CCTCTCCCGC	840
ACTCAAGCTA	TGCAGTATTA	AGCGCAATCC	TTAGGTTGAG	CCTAAGGCTT	TCACGCTTAA	900
CTCGCATAGC	CGCCTACGCA	CCCTTTACGC	CCAGTAATTC	CGGACAACGC	TCGCCACCTA	960
CGTATTACCG	CGGCTGCTGG	CACGTAGTTA	GCCGTGGCTT	TTTAAACGGG	TACTATCTCC	1020
TACTTCTCCC	CGTCCAAAGA	GGTTTACACC	CCGAAGGGCT	TCTTCCCTCA	CGCGCGGTCG	1080
CTGCGTCAGG	CTTCCGCCCA	TTGCGCAAGA	TTCCCCGCTG	CTGCCCTCCG	TAGGAGTGTG	1140
GGCCGTGTCT	CAGTCCCACT	GTGGCCGTAC	ACCCTCTCAG	GCCGGCTACC	CGTCGTGCGC	1200
TTGGTGAGCC	GTTACCCAC	CAACTAGCTG	ATGGGCCGGG	AGCCCATCCC	CAGCC	1255

FIGURA 14

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Caldicellulosiruptor* sp. DIB107C (SEQ ID NO. 7)

GACTTCACCC	CCAATCATCA	GCCCCACCTT	CAACACAGCT	TAACCTGTGT	CTTCAGGTGT	60
TGCTGACTCT	CATGGTGTGA	CGGGCGGTGT	GTACAAGGCC	CGGGAACGTA	TTCACCGCGG	120
CATGCTGATC	CGCGATTACT	AGCGATTCCG	ACTTCATGCA	GGCGAGTTGC	AGCCTGCAAT	180
CCGAACTGGG	GGTGCTTTTT	TGGGATTCCG	TCCGGCTCGC	GCCTTCGCAC	GCCCTCTGTA	240
GCACCCATTG	TAGCACGTGT	GTAGCCCAGG	GCATAAGGGG	CATGATGATT	TGACGTCATC	300
CCCACCTTCC	TCCGCCTCAT	CGACGGCAGT	CCCCTTAGAG	TGCCCACCAT	TACGCGCTGG	360
CAACTAAGGG	CAGGGGTTGC	GCTCGTTGCG	GGACTTAACC	CAACATCTCA	CGACACGAGC	420
TGACGACAAC	CATGCACCAC	CTGTGTCCGG	GCTCCTGCTC	TCATCGAACA	GGCACCCAC	480
CCTTTCGGGC	AGGTCCCCGG	CATGTCAAGC	CCTGGTAAGG	TTCTTCGCGT	TGCTTCGAAT	540
TAAACCACAT	GCTCCACCGC	TTGTGCGGGC	CCCCGTCAAT	TCCTTTGAGT	TTCAACCCTG	600
CGGCCGTACT	CCCCAGGCGG	GATGCTTATP	GTGTTAACTA	CGGCACGGAG	GAGTCCTTCT	660
CCCCCACACC	TAGCATCCAT	CGTTTACAGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	ATCCTGPTCG	720
CTCCCCACGC	TTTCGTGCCT	CAGCGTCAGT	TACGGTCCAG	ACGGCCGCCT	TCGCCACTGG	780
TGTTCCCTCCC	GATATCTACG	CATTTACCCG	CTACACCGGG	AATTCGCGCG	TCCTCTCCCG	840
CACTCAAGCT	ATGCAGTATT	AAGCGCAATC	CTTAGGTTGA	GCCTAAGGCT	TTCACGCTTA	900
ACTCGCATAG	CCGCCTACGC	ACCCTTTACG	CCCAGTAATT	CCGGACAACG	CTCGCCACCT	960
ACGTATTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGTGGCT	TTTTAAACGG	GTACTIONCTC	1020
CTACTTCTCC	CCGTCCAAAG	AGGTTTACAC	CCCGAAGGGC	TTCTTCCCTC	ACGCGGGGTC	1080
GCTGCGTCAG	GCTTCCGCCC	ATTGCGCAAG	ATTCCCCGCT	GCTGCCTCCC	GTAGGAGTGT	1140
GGGCCGTGTC	TCAGTCCAC	TGTGGCCGTA	CACCCTCTCA	GGCCGGCTAC	CCGTGCTCGC	1200
CTTGGTGAGC	CGTTACCTCA	CCAACTAGCT	GATGGGCCGC	GAGCCCATCC	CCAGCCGGAT	1260
TACTCCTTTC	ACCACATCAC	CATGCGATGA	CGTGGTCCCA	TCGGGTATTA	GCAGCCCTTT	1320
CGAGCTGTTA	TCCCCGTGCT	GGGGGTAGGT	TGCTCACGTG	TTACTCACCC	GTCCGCGGCT	1380
AAGATGGCAG	CCTCCAGCTC	ATCACCTTCA	ACCACCAICT	CCGCTCGACT	TGCATGCGTT	1440
AGGCACGCCG	CCAGCGTTCC	TCCTGA				1446

FIGURA 15

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Thermoanaerobacter* sp. DIB004C (SEQ ID NO. 8)

ggttgggtca	cgggettcgg	gtgtcgcagg	ctctcgtggt	gtgacggggc	gtgtgtacaa	60
ggccccggaa	cgtattcacc	goggcattgct	gatcogcgat	tactagcgat	tccgacttca	120
tgcaggogag	ttgcagcctg	caatccgaac	ttggacoggc	tttttgggat	tgcctccggc	180
tcacggcttc	gcttccctct	gtaccggcca	ttgtagcacg	tgtgtggccc	agggcattta	240
gggcatgatg	atttgaogtc	atccccacct	tcctccoggt	cctccacggc	agtcctctta	300
gagtgcocgg	cttaccocgt	ggcaactaga	ggcaggggtt	gogctcgttg	cgggacttaa	360
cccaacatct	cacgacacga	gctgacgaca	accatgcacc	acctgtgcag	gctccttacc	420
tcccggtaag	gtcgcctccc	ttcgggttcg	ctactacctg	catgtcaagc	cctggtaagg	480
ttcttcgggt	tgcttcgaat	taaaccacat	gctccaocgc	ttgtcggggc	ccccgtcaat	540
tcctttgagt	ttcaaccttg	cggccgtact	ccccaggcgg	ggtacttatt	gcgttcgcta	600
cggcacggaa	cgcttcocgg	ccccacacct	agtaccatc	gtttacagcg	tggactacca	660
gggtatctaa	tcctgttcgc	tccccacgct	ttcogocctc	agcgtcaggg	ccagtccaga	720
gagtgcocctt	cgccactggt	attcctcccg	atatctacgc	atltcaccgc	tacaccggga	780
attccactcc	cctctcctgc	cctctagcca	atcagtttca	gatgtacc	cccggttgag	840
cccgggtctt	ttacacctga	cttgattgac	cgcctaocgg	ccctttacgc	ccagtaattc	900
cggacaacgc	tgccccccta	cgtcttaccg	cggctgctgg	cacgtagtta	gcgggggctt	960
togtgtggta	ccgtcatccc	ttcttcccac	actaacgggg	tttacaacc	gaaggccttc	1020
ctccccacg	cggcgtcgc	gggtcaggct	tcgcgccatt	gccaagatt	ccccactgct	1080
gctcccgta	ggagtctggg	cogtgtctca	gtcccagtg	ggcogtccac	cctctcaggc	1140
cggctaccog	tcgtcgcctt	ggtaggccgt	taccctacca	actagctgat	gggacogggg	1200
cccataccta	agcggtagct	tgcgcttccc	tttctcctct	ataggatgcc	ctataaggag	1260
cttatccagt	attaccaccc	ctttcgaggt	gctatoccg	tcttaagggt	aggttgccca	1320
cgcgttactc	accogtccgc	cgtatocgc	cacccaacta	cgttgagtgc	cggaccgctc	1380
gactgcatgt	gttaggcacg	cgcgcagcgt	tcgtcctgag	cc		1422

FIGURA 16

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Thermoanaerobacter* sp. DIB087G (SEQ ID NO. 9)

ACTCAAGTGG	GCACGTTTTT	TTCTCTTCAT	CACGTTTCTA	ACATGCCAC	TTGAGTGCCG	60
GGTTGGGTCA	CCGGCTTCGG	GTGTTGCAGA	CTCTCGTGGT	GTGACGGGCG	GTGTGTACAA	120
GGCCCGGGAA	CGTATTCAAC	GCGGCATGCT	GATCCGCGAT	TACTAGCGAT	TCCGACTTCA	180
TGCAGGCGAG	TTGCAGCCTG	CAATCCGAAC	TPGGACCGGC	TTTTTGGGGT	CCGCTCCAGA	240
TCGCTCCTTC	GCCTCCCTCT	GTACCGGCCA	TTGTAGCACG	TGTGTGGCCC	AGGGCATATA	300
GGGCATGATG	ATTTGACGTC	ATCCCCACCT	TCCTCCGTGT	TGTCCACGGC	AGTCCCTCTA	360
GAGTGCCTCC	GTCACTCAAC	TGAACACGCT	ATCCCTTCCT	CTCTACTCTT	TCCTAACATG	420
TTCAGTTGAG	TGACGGACTG	GCAACTAGAA	GCAAGGGTTG	CGCTCGTTGC	GGGACTTAAC	480
CCAACATCTC	ACGACACGAG	CTGACGACAA	CCATGCACCA	CCTGTGCAGG	CTCCCGGCAC	540
TCAAGTAGGC	ACTTCATTCT	CCCTCTTACT	ACCTTCTCTA	TCATGCCAC	TTGAGTGCCG	600
GGTCGCTCAC	CTTTCCGGCTC	GCTACTACCT	GCATGTCAAAG	CCCTGGTAAAG	GTTCTTCGGC	660
TTGCTTCGAA	TTAAACCACA	TGCTCCACCG	CTTGTGCGGG	CCCCCGTCAA	TTCTTTGAG	720
TTTCAACCTT	GCGGCCGTAC	TCCCAGGGCG	GGGTACTTAT	TGCGTAAACT	ACGGCACGGA	780
ATGCTTCCGC	ATCCCACACC	TAGTACCCAT	CGTTTACGGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	840
ATCCTGTTTG	CTCCCCACGC	TTTCGCGCCT	CAGCGTCAGG	GTCAGTCCAG	AGAGTCGCCT	900
TCGCCACTGG	TATTCCTCCC	GATATCTACG	CATTTACCCG	CTACACCGGG	AATTCCACTC	960
CCCTCTCCTG	CCCTCTAGCC	ACCCAGTTTC	ATGTGCATCC	CCCCGGTTGA	GCCCGGGTPT	1020
TTTACACCTG	ACTTAAGTGG	CCGCCTACGC	GCCCTTTACG	CCCAGTAATT	CCGGACAACG	1080
CTCGCCCCCT	ACGTCTTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGGGGCT	TTCGTGTGGT	1140
ACCGTCATCT	ATTCTTCCCA	CACTATCGAG	CTTTACGACC	CGAAGGCCTT	CTTCGCTCAC	1200
GCGGCCTCGC	TGCGTCAGGC	TTTCGCCCAT	TGCGCAAGAT	TCCCCACTGC	TGCCTCCCGT	1260
AGGAGTCTGG	GCCGTGTCTC	AGTCCCAGTG	TGGCCGACCA	CCCTCTCAGG	CCGGCTACCC	1320
GTGTCGCCT	TGGTAGCCCG	TTACCCTACC	AACTAGCTGA	TGGGACGCGG	GCCCATCCTT	1380
AAGCGGTAGC	TTCCGCTACC	TTCCCTCCTC	ATAGGATGCC	CTACAAGGAG	CTTATCCAGT	1440
ATTAGCACCC	CTTTCCGAGGT	GTTATCCCGG	TCTTAAGGGT	AGGTTGCCCA	CGCGTTACTC	1500
ACCOGTCCGC	CGTATCCGG	CACTCAACTC	CGTGCTTACC	TTACTTTGCA	CCACTTTTAT	1560
TACTTTCTTC	TTCTACTATA	CTTCCTTCCC	CTTAAGTAAG	CACTTAGTTG	AGTGCCGGAC	1620
CGCTCGACTT	GCATGTGTTA	GGCACGCCCG	CAGCGTTCC			1660

FIGURA 17

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Thermoanaerobacter* sp. DIB097X (SEQ ID NO. 10)

CCCGGTGGG	TCACCGGCTT	CGGGTGTCCG	AGGCTCTCGT	GGTGTGACGG	GCGGTGTGTA	60
CAAGGCCCGG	GAACGTATTC	ACCGGGGCAT	GCTGATCCGC	GATTACTAGC	GATTCCGACT	120
TCATGCAGGC	GAGTTGCAGC	CTGCAATCCG	AACTTGGACC	GGCTTTTGG	GATTTCGCTCC	180
GCCTCGCGGC	TTCGCTCCCC	TCTGTACCCG	CCATTGTAGC	ACGTGTGTGG	CCCAGGGCAT	240
ATAGGGCATG	ATGATTTGAC	GTCATCCCCA	CCTTCTCCG	TGTCTCCAC	GGCAGTCCCC	300
CTAGAGTGCC	CGGCTTACCC	GCTGGCAACT	AGAGGCAGGG	GTTGCGCTCG	TGCGGGGACT	360
TAACCCAACA	TCTCAGACA	CGAGCTGACG	ACAACCATGC	ACCACCTGTG	CAGGCTCCTT	420
ACCTCCCGGT	AAGGTCGCTC	CCCTTTCGGT	TCGCTACTAC	CTGCATGTCA	AGCCCTGGTA	480
AGGTTCTTCG	CGTTGCTTCG	AATTA AACCA	CATGCTCCAC	CGCTTGTGCG	GGCCCCCGTC	540
AATTCCTTTG	AGTTTCAACC	TTGCGGCCGT	ACTCCCCAGG	CGGGTACTT	ATTGCGTTCG	600
CTACGGCAGC	GAACGCTTCC	GCGCCCCACA	CCTAGTACCC	ATCGTTTACA	GCGTGGACTA	660
CCAGGGTATC	TAATCCTGTT	CGCTCCCCAC	GCTTTCGGC	CTCAGCGTCA	GGGCCAGTCC	720
AGAGAGTCGC	CTTCGCCACT	GGTATTCCTC	CCGATATCTA	CGCATTTTAC	CGCTACACCG	780
GGAAATCCAC	TCCCCCTCCT	TGCCCTCTAG	CCAATCAGTT	TCAGATGCTA	CCCCGGGTT	840
GAGCCCCGGT	CTTTTACACC	TGACTTGATT	GACCGCTAC	GCGCCCTTTA	CGCCAGTAA	900
TTCCGGACAA	CGCTCGCCCC	CTACGTCTTA	CCGCGGCTGC	TGGCACGTAG	TTAGCCGGGG	960
CTTTCGTGTG	GTACCGTCAT	CCCTTCTTCC	CACACTAACG	GGTTTACAA	CCCGAAGGCC	1020
TTCCCTCCCC	ACGCGGCGTC	GCTGGGTCCAG	GCTTCCGCC	ATTGCCCAAG	ATTCCCCACT	1080
GCTGCCTCCC	GTAGGAGTCT	GGGCCGTGTC	TCAGTCCCAG	TGTGGCCGAC	CACCCTCTCA	1140
GGCCGGCTAC	CCGTCGTGCG	CTTGGTAGGC	CGTTACCCTA	CCAACTAGCT	GATGGGACGC	1200
GGCCCATCC	TTAAGCGGTA	GCTTGCCTCC	CCCTTTCCTC	CCTATAGGAT	GCCCTATAAG	1260
GAGCTTATCC	AGTATTACCA	CCCTTTCCGA	GGTGCTATCC	CGGTCTTAAG	GGTAGGTTGC	1320
CCAACGCTTA	CTCACCGTCC	CGCCGCTATC	CGCCACCCAA	CTACGTTGAG	TGCCGGACCG	1380
CTCGACTTGC	ATGTGTTAGG	CACGCCGCCA	GCGTTCGTCC	TGAGCCATGA	TCAAAC	1436

FIGURA 18

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Thermoanaerobacter* sp. DIB101G (SEQ ID NO. 11)

gctcaggacg	aacgctggcg	gcgtgcctaa	cacatgcaag	tcgagcggtc	cggcactcaa	60
ctaagtgctt	acttaagggg	aaggaagtat	agtagaagaa	gaaggtaata	aaagtgatgc	120
aaagtaaggt	aagcacggag	ttgagtgccg	gatagcggcg	gacgggtgag	taacgcgtgg	180
gcaacctacc	cttaagaccg	ggataacacc	tcgaaagggg	tgctaatact	ggataagctc	240
cttgtagggc	atcctatgag	gagggaaaggt	agcggaaagct	accgcttaag	gatgggcccg	300
ogtcccatca	gctagttagt	agggtaacgg	cctaccaagg	cgacgacggg	tagccggcct	360
gagaggggtg	tcggccacac	tgggactgag	acacggccca	gactcctacg	ggaggcagca	420
gtgggggaatc	ttgcgcaatg	ggcgaagcc	tgacgcagcg	acgccgcgtg	agcgaagaag	480
gccttcgggt	cgtaaagctc	gatagtgtgg	gaagaataga	tgacggtaac	acacgaaagc	540
cccggctaac	tacgtgccag	cagccgcggg	aagacgtagg	gggcgagcgt	tgtccggaat	600
tactgggcgt	aaagggcgcg	taggcggcca	cttaagtcag	gtgtaaaaa	cccgggctca	660
accoggggga	tgacacatgaa	actgggtggc	tagagggcag	gagaggggag	tggaattccc	720
ggtgtagcgg	tgaaatgcgt	agatatcggg	aggaatacca	gtggcgaagg	cgactctctg	780
gactgaccct	gacgctgagg	cgcgaaagcg	tggggagcaa	acaggattag	ataccctggt	840
agtccacgcc	gtaaacgatg	ggtactaggt	gtgggatgcg	gaagcattcc	gtgccgtagt	900
taacgcaata	agtaccccg	ctggggagta	cggccgcaag	gttgaaactc	aaaggaattg	960
acggggggccc	gcacaagcgg	tggagcatgt	ggtttaattc	gaagcaacgc	gaagaacctt	1020
accagggctt	gacatgcagg	tagtagcggg	ccgaaaggtg	agcgaccggg	cactcaagtg	1080

FIGURA 19

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Thermoanaerobacter* sp. DIB101X (SEQ ID NO. 12)

GCCCCACTTT	CGACGGCTCC	CTCCTTCCCG	GTTGGGTAC	CGGCTTCGGG	TGTCGCAGGC	60
TCTCGTGGTG	TGACGGGGCG	TGTGTACAAG	GCCCCGGAAC	GTATTCACCG	CGGCATGCTG	120
ATCCGCGATT	ACTAGCGATT	CCGACTTCAT	GCAGGCGAGT	TGCAGCCTGC	AATCCGAACT	180
TGGACCGGCT	TTTTGGGATT	CGCTCCGCCT	CGCGGCTTCG	CTTCCCTCTG	TACCGGCCAT	240
TGTAGCACGT	GTGTGGCCCA	GGGCATATAG	GGCATGATGA	TTTGACGTCA	TCCCCACCTT	300
CCTCCGTGTC	CTCCACGSCA	GTCCCTCTAG	AGTGCCCGGC	TTACCCGCTG	GCAACTAGAG	360
GCAGGGGTTG	CGCTCGTTGC	GGGACTTAAC	CCAACATCTC	ACGACACGAG	CTGACGACAA	420
CCATGCACCA	CCTGTGCAGG	CTCCTTACCT	CCCCGTAAGG	TGGCTCCCCT	TTGGTTCCG	480
TACTACCTGC	ATGTCAAGCC	CTGGTAAGGT	TCTTCGCGTT	GCTTCGAATT	AAACCACATG	540
CTCCACCGCT	TGTGCGGGCC	CCCGTCAATT	CCTTTPGAGTT	TCAACCTTGC	GGCCGTACTC	600
CCCAGGGCGG	GTACTTATTG	CGTTCGCTAC	GGCACGGAAC	GCTTCCGGGC	CCCACACCTA	660
GTACCCATCG	TTTACAGCGT	GGACTACCAG	GGTATCTAAT	CCTGTTGCGT	CCCCACGCTT	720
TCGGCCCTCA	GCGTCAGGGC	CAGTCCAGAG	AGTCGCCTTC	GCCACTGGTA	TTCTCCCGA	780
TATCTACGCA	TTTCACCGCT	ACACCGGGAA	TTCCACTCCC	CTCTCCTGCC	CTCTAGCCAA	840
TCAGTTTCAG	ATGCTACCCC	CGGGTTGAGC	CCGGGTCTTT	TACACCTGAC	TTGATTGACC	900
GCCTACGCGC	CCTTTACGCC	CAGTAATTCC	GGACAACGCT	CGCCCCCTAC	GTCTTACCGC	960
GGCTGCTGGC	ACGTAGTTAG	CCGGGGCTTT	CGTGTGGTAC	CGTCATCCCT	TCTTCCCACA	1020
CTAACGGGGT	TTACAACCCG	AAGGCCTTCC	TCCCCACGC	GGCGTCGCTG	GGTCAGGCTT	1080
CCGCCCATTG	CCCAGATTTC	CCCCTGCTG	CCTCCCGTAG	GAGTCTGGGC	CGTGTCTCAG	1140
TCCCAGTGTG	GCCGACCACC	CTCTCAGGCC	GGCTACCCGT	CGTCGCCTTG	GTAGGCCGTT	1200
ACCTTACCAA	CTAGCTGATG	GGACGCGGGC	CCATCGTTAA	GCGGTAGCTT	GCGCTCCCT	1260
TTCTCCCTA	TAGGATGCC	TATAAGGAGC	TTATCCAGTA	TTACCACCCC	TTTCGAGGTG	1320
CTATCCCGGT	CCTAAGGGTA	GGTTGCCAC	GCGTTACTCA	CCCCTCCGCC	GCTATCCGCC	1380
ACCCAACCTAC	GTTGAGTGCC	GGACCGCTCG	ACTTGCATGT	GTTAGGCACG	CCGCCAGCGT	1440
TCGTCCTGAG	C					1451

FIGURA 20

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Thermoanaerobacter* sp. DIB103X (SEQ ID NO. 13)

TTCACCCCAA	TCACCTGCCC	CACCTTCGAC	GGCTCCCTCC	TCCCCGGTTG	GGTCACCGGC	60
TTCGGGTGTC	GCAGGCTCTC	GTGGTGTGAC	GGGCGGTGTG	TACAAGGCC	GGGAACGTAT	120
TCACCGCGGC	ATGCTGATCC	GCGATTACTA	GCGATTCCGA	CTTCATGCAG	GCGAGTTGCA	180
GCTTGCAATC	CGAACTTGA	CCGGCTTTTT	GGGATTCGCT	CCGCCTCGCG	GCTTCGCTCC	240
CCTCTGTACC	GGCCATTGTA	GCACGTGTGT	GGCCCAGGGC	ATATAGGGCA	TGATGATTTG	300
ACGTCATCCC	CACCTTCCTC	CGTGTCTCTC	ACGGCAGTCC	CCCTAGAGTG	CCCGGCTTAC	360
CCGCTGGCAA	CTAGAGGCAG	GGGTTGCGCT	CGTTGCGGGA	CTTAACCCAA	CATCTCACGA	420
CACGAGCTGA	CGACAACCAT	GCACCACCTG	TGCAGGCTCC	TTACCTCCCG	GTAAGGTCGC	480
TCCCTTTTCG	GTTTCGCTACT	ACCTGCATGT	CAAGCCCTGG	TAAGGTTCTT	CGCGTTGCTT	540
CGAATTA AAC	CACATGCTCC	ACCGCTTGTG	CGGGCCCCCG	TCAATTCCCT	TGAGTTTCAA	600
CCTTGC GGCC	GTACTCCCCA	GGCGGGGTAC	TTATTGCGTT	CGCTACGGCA	CGGAACGCTT	660
CCGGCCCCCA	CACCTAGTAC	CCATCGTTTA	CAGCGTGGAC	TACCAGGGTA	TCTAATCCTG	720
TTCGCTCCCC	ACGCTTTCCG	GCCTCAGCGT	CAGGGCCAGT	CCAGAGAGTC	GCCTTCGCCA	780
CTGGTATTCC	TCCCGATA TC	TACGCATTT C	ACCGCTACAC	CGGGAATTCC	ACTCCCCTCT	840
CCTGCCCTCT	AGCCAATCAG	TTTCAGATGC	TACCCCCGGG	TTGAGCCCGG	GTCTTTTACA	900
CCTGACTTGA	TTGACCGCCT	ACGCGCCCTT	TACGCCAGT	AATTCCGGAC	AACGCTCGCC	960
CCCTACGTCT	TACCGCGGCT	GCTGGCACGT	AGTTAGCCGG	GGCTTTCGTG	TGGTACCGTC	1020
ATCCCTTCTT	CCCACACTAA	CGGGGTTTAC	AACCCGAAGG	CCTTCCTCCC	CCACGGGGCG	1080
TCGCTGGGTC	AGGCTTCCGC	CCATTGCCCA	AGATTCCCCA	CTGCTGCCTC	CCGTAGGAGT	1140
CTGGGCCGTG	TCTCAGTCCC	AGTGTGGCCG	ACCACCCCTCT	CAGGCCGGCT	ACCCGTCGTC	1200
GCCTTGGTAG	GCCGTTACCC	TACCAACTAG	CTGATGGGAC	GCGGGCCCAT	CCTTAAGCGG	1260
TAGCTTGGCG	CTCCCTTTCC	TCCCTATAGG	ATGCCCTATA	AGGAGCTTAT	CCAGTATTAC	1320
CACCCCTTTC	GAGGTGCTAT	CCCGGTCTTA	AGGGTAGGTT	GCCCACGCGT	TACTCACCCG	1480
TCCGCCGCTA	TCCGCCACCC	AACTACGTTG	AGTGCCGGAC	CGCTCGACTT	GCATGTGTTA	1540
GGCACGCCGC	CAGCGTTCGT	CCTGA				1565

FIGURA 21

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Thermoanaerobacter* sp. DIB104X (SEQ ID NO. 14)

ACTCAAGTGG	GCACGTTTTT	TTCTCTTCAT	CACGTTTCTA	ACATGCCCCAC	TTGAGTGCCG	60
GGTTGGGTCA	CCGGCTTCGG	GTGTTGCAGA	CTCTCGTGGT	GTGACGGGGC	GTGTGTACAA	120
GGCCCGGGAA	CGTATTCACC	GCGGCATGCT	GATCCGCGAT	TACTAGCGAT	TCCGACTTCA	180
TGCAGGGGAG	TTGCAGCCTG	CAATCCGAAC	TTGGACGGGC	TTTTTGGGGT	CCGCTCCAGA	240
TCGCTCCTTC	GCCPCCCTCT	GTACCGGGCA	TTGTAGCACG	TGTTGTGGCC	AGGGCATATA	300
GGGCATGATG	ATTTGACGTC	ATCCCCACCT	TCCTCCGTGT	TGTCCACGGC	AGTCCCTCTA	360
GAGTGCCTCC	GTCACTCAAC	TGAACACGCT	ATCCCTTCTT	CTCTACTCTT	TCCTAACATG	420
TTCAGTTGAG	TGACGGACTG	GCAACTAGAA	GCAAGGGTTG	CGCTCGTTGC	GGGACTTAAC	480
CCAACATCTC	ACGACACGAG	CTGACGACAA	CCATGCACCA	CCTGTGCAGG	CTCCCGGCAC	540
TCAAGTAGGC	ACTTCATTCT	CCCTCTTACT	ACCTTCTCTA	TCATGCCCCAC	TTGAGTGCCG	600
GGTCGCTCAC	CTTTCGGCTC	GCTACTACCT	GCATGTCAAG	CCCTGGTAAG	GTTCTTCGCG	660
TTGCTTCGAA	TTAAACCACA	TGCTCCACCG	CTTGTGCGGG	CCCCCGTCAA	TTCTTTGAG	720
TTTCAACCTT	GCGGCCGTAC	TCCCCAGGCG	GGTACTTAT	TGCGTAACT	ACGGCACGGA	780
ATGCTTCGCG	ATCCACACCC	TAGTACCCAT	CGTTTACGGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	840
ATCCTGTTTG	CTCCCCACGC	TTTCGCGCCT	CAGGTCAGG	GTGAGTCCAG	AGAGTCGCCT	900
TCGCCACTGG	TATTCCTCCC	GATATCTACG	CATTTACCCG	CTACACCGGG	AATTCCACTC	960
CCCTCTCCTG	CCCTCTAGCC	AOCCAGTTTC	ATGTGCATCC	CCCGGGTTGA	GCCCGGGTTT	1020
TTTACACCTG	ACTTAAAGTGG	CCGCCTACGC	GCCCTTTACG	CCCAGTAATT	CCGGACAACG	1080
CTCGCCCCCT	ACGTCCTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGGGGCT	TTGCTGTGGT	1140
ACCGTCATCT	ATTCTTCCCA	CACTATCGAG	CTTTACGACC	CGAAGGCCTT	CTTCGCTCAC	1200
GCGGCGTTCG	TGCGTCAGGC	TTTCGCCCCAT	TGCGCAAGAT	TCCCCACTGC	TGCCTCCCGT	1260
AGGAGTCTGG	GCCGTGTCTC	AGTCCCAGTG	TGGCCGACCA	CCCTCTCAGG	CCGGCTACCC	1320
GTCGTGCGCT	TGGTAGGCCG	TTACCCTACC	AACTAGCTGA	TGGGACGCGG	GCCCATCCTT	1380
AAGCGGTAGC	TTCCGCTACC	TTCCCTCCTC	ATAGGATGCC	CTACAAGGAG	CTTATCCAGT	1440
ATTAGACCCC	CTTTCGAGGT	GTTATCCCGG	TCTTAAGGGT	AGGTTGCCCA	CGCGTTACTC	1500
ACCCGTCCGC	CGCTATCCGG	CACTCAACTC	CGTGCTTACC	TTACTTTGCA	CCACTTTTAT	1560
TACTTTCTTC	TTCTACTATA	CTTCCTTCCC	CTTAAGTAAG	CACTTAGTTG	AGTGCCGGAC	1620
CGCTCGACTT	GCATGTGTTA	GGCACGCCGC	CAGCGTTCGT	CCTGA		1665

FIGURA 22

Secuencia consenso de 16Sr DNA para *Thermoanaerobacter* sp. DIB107X (SEQ ID NO. 15)

TCAGGACGAA	CGCTGGCGGC	GTGCCTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGTCCG	GCACTCAACG	60
TAGTTGAGTG	GCGGATAGCG	GCGGACGGGT	GAGTAACCGG	TGGGCAACCT	ACCCCTAAGA	120
CCGGGATAGC	ACCTCGAAAG	GGTGGTAAAT	ACTGGATAAG	CTCCTTATAG	GGCATCCTAT	180
AGGGAGGAAA	GGGAAGCGCA	AGCTACCGCT	TAAGGATGGG	CCC CGGTCCC	ATCAGCTAGT	240
TGGTAGGGTA	ACGGCCTACC	AAGGCKACGA	CGGGTAGCCG	GCCTGAGAGG	GTGGTCGGCC	300
ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATCTTGGGC	360
AATGGGCGGA	AGCCTGACCC	AGCGACGCCG	CGTGGGGGAG	GAAGGCCTTC	GGGTTGTAAA	420
CCCCGTTAGT	GTGGGAAGAA	GGGATGACGG	TACCACACGA	AAGCCCGGC	TAACTACGTG	480
CCAGCAGCCG	CGGTAAGACG	TAGGGGGCGA	GCGTTGTCCG	GAATTACTGG	GCGTAAAGGG	540
CGCGTAGGCG	GTCAATCAAG	TCAGGTGTAA	AAGACCCGGG	CTCAACCCGG	GGGTAGCACC	600
TGAAACTGGT	TGGCTAGAGG	GCAGGAGAGG	GGAGTGGAAAT	TCCCGGTGTA	GCGGTGAAAT	660
GCGTAGATAT	CGGGAGGAAT	ACCAGTGGCG	AAGGCGACTC	TCTGGACTGG	CCCTGACGCT	720
GAGGCGCGAA	AGCGTGGGGA	GCGAACAGGA	TTAGATACCC	TGGTAGTCCA	CGCTGTAAAC	780
GATGGGTACT	AGGTGTGGGG	CGCGGAAGCG	TTCCGTGCCG	TAGCGAACGC	AATAAGTACC	840
CCGCCTGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGTTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	GCCCGCACAA	900
GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA	ATTCGAAGCA	ACGCGAAGAA	CCTTACCAGG	GCTTGACATG	960
CAGGTGGTAG	CGAACCGAAA	GGTGAGCGAC	CTTACCGGGA	GGTAAGGAGC	CTGCACAGGT	1020
GGTGCATGGT	TGTCGTACGC	TGGTGTCTGT	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCCG	1080
AACCCCTGCC	TCTAGTTGCC	AGCGG				1105