

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 476**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/54 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2012 PCT/EP2012/069808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050582**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2012 E 12780430 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2764087**

54 Título: **Bacterias extremadamente termófilas versátiles para la conversión de biomasa**

30 Prioridad:

07.10.2011 US 201161544831 P

07.10.2011 EP 11008155

07.11.2011 US 201161556448 P

07.11.2011 EP 11008857

10.07.2012 EP 12175684

10.07.2012 US 201261669998 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2017

73 Titular/es:

**DIREVO INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY GMBH
(100.0%)**

**Nattermannallee 1
50829 Köln, DE**

72 Inventor/es:

**SVETLITCHNYI, VITALY y
CURVERS, SIMON**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 644 476 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

Bacterias extremadamente termófilas versátiles para la conversión de biomasa

Campo de la descripción

5 La presente descripción se refiere a nuevas células bacterianas termófilas aisladas xilanolíticas, amilolíticas y sacarolíticas pertenecientes al género *Thermoanaerobacter*, cepas aisladas, cultivos microbianos y composiciones que comprenden dichas células.

Antecedentes

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

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

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

25 Por lo general, la primera etapa en la utilización de biomasa lignocelulósica es una etapa de pretratamiento, con el fin de fraccionar los componentes de material lignocelulósico y aumentar su área superficial. El método de pretratamiento más usado es el pretratamiento con vapor, un proceso que comprende calentar el material lignocelulósico por inyección de vapor hasta una temperatura de 130 a 230 °C. Antes o durante el pretratamiento con vapor, se puede añadir opcionalmente un catalizador tal como un ácido mineral u orgánico, o un agente cáustico que facilite la desintegración de la estructura de la biomasa.

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

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

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

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

Las cuatro transformaciones mediadas biológicamente pueden tener lugar en una sola etapa en una configuración de proceso denominada bioprocesamiento consolidado (CBP), que se distingue de otras configuraciones menos integradas en que el CBP no implica una etapa de proceso dedicada para la producción de celulosa y/o hemicelulosa. El CBP ofrece el potencial para una mayor eficiencia que los procesos que requieren una producción
55 de celulosa dedicada en una operación unitaria distinta.

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

Compendio de la descripción

5 La presente descripción se refiere a métodos, microorganismos y composiciones útiles para procesar hidrolizados lignocelulósicos. La presente invención se define según las reivindicaciones y se refiere a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. capaz de crecer y producir un producto químico a base de carbono a una temperatura superior a 70 °C que comprende una secuencia de ADNr 16S de SEQ ID NO:1, y en donde la célula es DIB004G depositada con el número de acceso DSMZ 25179.

10 En un primer aspecto, las realizaciones de la descripción proporcionan nuevas células bacterianas termófilas aisladas sacarolíticas y amilolíticas o sacarolíticas, amilolíticas y xilanolíticas, respectivamente, pertenecientes al género *Thermoanaerobacter*, en particular, capaces de producir altos niveles de etanol y/o ácido láctico a partir de hidrolizados lignocelulósicos, produciendo a la vez bajos niveles de ácido acético.

15 Las realizaciones de la presente descripción se refieren a células aisladas de *Thermoanaerobacter* sp. que comprenden un ADNr 16S con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, o sus homólogos.

20 En un aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a las células aisladas DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp., DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp., DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp., DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp., DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp., DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp., DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp. o DIB107X de *Thermoanaerobacter* sp., cada una caracterizada respectivamente por tener una secuencia de ADNr 16S al menos del 99 al 100 %, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 como se indica en la Tabla 1.

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

25 Por consiguiente, la presente descripción se refiere a cepas aisladas de *Thermoanaerobacter* sp. seleccionadas del grupo que consiste en DIB004G, DIB087G, DIB097X, DIB101G, DIB101X, DIB103X, DIB104X y DIB107X, todas ellas enumeradas con sus respectivos números de acceso y fechas de deposición en la Tabla 1, células derivadas de las mismas, mutantes de las mismas, progenies u homólogos.

30 En un aspecto, la descripción se basa en el aislamiento de las cepas de *Thermoanaerobacter* DIB097X, DIB101X, DIB103X, DIB104X y DIB107X, que son capaces de crecer y producir altos niveles de productos de fermentación a base de carbono a partir de hidrolizados lignocelulósicos y/o directamente a partir de poli-, oligo-, di- y/o monosacáridos, en particular, de poli-, oligo-, di- y/o monosacáridos derivados de biomasa lignocelulósica pretratada, estando los polisacáridos limitados a hemicelulosas, por ejemplo, xilano y almidón.

35 La descripción se basa además en el aislamiento de las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. DIB004G, DIB087G y DIB101G, que son capaces de crecer y producir altos niveles de productos de fermentación a base de carbono a partir de hidrolizados lignocelulósicos y/o directamente a partir de poli-, oligo-, di- y/o monosacáridos, en particular, de poli-, oligo-, di- y/o monosacáridos derivados de biomasa lignocelulósica pretratada, estando los polisacáridos limitados al almidón.

40 Una de las ventajas de los microorganismos según la presente descripción y sus mutantes son la amplia especificidad del sustrato, ya que son capaces de utilizar pentosas tales como xilosa y arabinosa, y hexosas tales como glucosa, manosa, fructosa y galactosa. Las cepas tienen además la ventaja de ser extremadamente termófilas y, por lo tanto, son capaces de crecer a temperaturas muy elevadas, dando lugar a altas productividades y tasas de conversión de sustrato, con un bajo riesgo de contaminación y fácil recuperación del producto.

45 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. que comprende un ADNr 16S que comprende la secuencia SEQ ID NO 1.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp. caracterizada por tener una secuencia de ADNr 16S al menos un 99 por ciento, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 1.

50 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. que comprende un ADNr 16S que comprende la secuencia SEQ ID NO 2.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp. caracterizada por tener una secuencia de ADNr 16S al menos un 99 por ciento, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 2.

En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de

ES 2 644 476 T3

Thermoanaerobacter sp. que comprende un ADNr 16S que comprende la secuencia SEQ ID NO 3.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp. caracterizada por tener una secuencia de ADNr 16S al menos un 99 por ciento, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 3.

- 5 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. que comprende un ADNr 16S que comprende la secuencia SEQ ID NO 4.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp. caracterizada por tener una secuencia de ADNr 16S al menos un 99 por ciento, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 4.

- 10 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. que comprende un ADNr 16S que comprende la secuencia SEQ ID NO 5.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp. caracterizada por tener una secuencia de ADNr 16S al menos un 99 por ciento, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 5.

- 15 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. que comprende un ADNr 16S que comprende la secuencia SEQ ID NO 6.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp. caracterizada por tener una secuencia de ADNr 16S al menos un 99 por ciento, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 6.

- 20 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. que comprende un ADNr 16S que comprende la secuencia SEQ ID NO 7.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp. caracterizada por tener una secuencia de ADNr 16S al menos un 99 por ciento, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 7.

- 25 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. que comprende un ADNr 16S que comprende la secuencia SEQ ID NO 8.

En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a una DIB107 de *Thermoanaerobacter* sp. caracterizada por tener una secuencia de ADNr 16S al menos un 99 por ciento, preferiblemente del 99,5 al 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO 8.

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

En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp. depositada como DSM 25179, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp.

- 35 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp. depositada como DSM 25777, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp.

En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp. depositada como DSM 25308, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp.

- 40 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp. depositada como DSM 25180, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp.

En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp. depositada como DSM 25181, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp.

- 45 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp. depositada como DSM 25776, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp.

- 50 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa

DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp. depositada como DSM 25778, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp.

5 En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente descripción se refieren a un microorganismo de la cepa DIB107X de *Thermoanaerobacter* sp. depositada como DSM 25779, un microorganismo derivado del mismo, o un homólogo o mutante de DIB107X de *Thermoanaerobacter* sp.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a métodos de producción de uno o más productos de fermentación que comprende cultivar una o más células o cepas según la descripción en condiciones adecuadas.

10 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos para convertir hidrolizados lignocelulósicos en un biocombustible u otro producto químico basado en carbono, que comprenden la etapa de poner en contacto los hidrolizados lignocelulósicos con un cultivo microbiano durante un período de tiempo a una temperatura inicial y a un pH inicial, produciendo así una cantidad de biocombustible y/u otros productos basados en carbono; en donde el cultivo microbiano comprende un microorganismo extremadamente termófilo del género *Thermoanaerobacter*, en particular, cualquier microorganismo de la cepa *Thermoanaerobacter* sp. enumerado en la Tabla 1 con sus respectivos números de acceso, microorganismos derivados de los mismos, o mutantes u homólogos de los mismos.

20 En otro aspecto, las realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos para convertir almidón o materia prima que contiene almidón en un biocombustible u otro producto químico basado en carbono, que comprenden la etapa de poner en contacto la materia prima que contiene almidón con un cultivo microbiano durante un período de tiempo a una temperatura inicial y a un pH inicial, produciendo así una cantidad de biocombustible y/u otros productos basados en carbono; en donde el cultivo microbiano comprende un microorganismo extremadamente termófilo del género *Thermoanaerobacter*, en particular, cualquier microorganismo de la cepa *Thermoanaerobacter* sp. enumerado en la Tabla 1 con sus respectivos números de acceso, microorganismos derivados de los mismos, o mutantes u homólogos de los mismos.

25 En otro aspecto más, las realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos para convertir una combinación o mezcla de hidrolizados lignocelulósicos y materia prima que contiene almidón en un biocombustible u otro producto químico basado en carbono, que comprenden la etapa de poner en contacto los hidrolizados lignocelulósicos con un cultivo microbiano durante un período de tiempo a una temperatura inicial y a un pH inicial, produciendo así una cantidad de biocombustible y/u otros productos basados en carbono; en donde el cultivo microbiano comprende un microorganismo extremadamente termófilo del género *Thermoanaerobacter*, en particular, cualquier microorganismo de la cepa *Thermoanaerobacter* sp. enumerado en la Tabla 1 con sus respectivos números de acceso, microorganismos derivados de los mismos, o mutantes u homólogos de los mismos.

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

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

40 Debe observarse que, como se emplean en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en singular y/o en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, se ha de entender que, en el caso de que se den intervalos de parámetros que estén delimitados por valores numéricos, se considera que los intervalos incluyen estos valores de limitación.

Breve descripción de los dibujos

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

45 La FIG. 2 muestra un ADNr 16S de célula DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp.

La FIG. 3 muestra un ADNr 16S de célula DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp.

La FIG. 4 muestra un ADNr 16S de célula DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp.

La FIG. 5 muestra un ADNr 16S de célula DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp.

La FIG. 6 muestra un ADNr 16S de célula DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp.

50 La FIG. 7 muestra un ADNr 16S de célula DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp.

La FIG. 8 muestra un ADNr 16S de célula DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp.

La FIG. 9 muestra un ADNr 16S de célula DIB107X de *Thermoanaerobacter* sp.

La FIG. 10 muestra una tabla que indica los datos de rendimiento de todas las cepas enumeradas en la Tabla 1 durante el cultivo sobre celobiosa, glucosa, xilano y xilosa.

5 La FIG. 11 muestra una tabla que indica los datos de rendimiento de todas las cepas enumeradas en la Tabla 1 durante el cultivo en madera de álamo pretratada y los datos de rendimiento de las cepas seleccionadas DIB004G y DIB097X en diferentes tipos de materias primas lignocelulósicas.

La FIG. 12 muestra un gráfico que presenta la formación de etanol, lactato y acetato durante el crecimiento de DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp. en pasto de *Miscanthus* pretratado.

10 La FIG. 13 muestra un gráfico que presenta la formación de etanol, lactato y acetato durante el crecimiento de DIB004C de *Thermoanaerobacter* sp. en semilla de maíz triturada.

Descripción detallada de la presente descripción

15 Como se mencionó anteriormente, la presente descripción se refiere a métodos, microorganismos y composiciones útiles para procesar hidrolizados lignocelulósicos. La descripción se refiere, en ciertos aspectos, a microorganismos que son capaces de convertir biomasa lignocelulósica pretratada tal como, por ejemplo, astillas de madera de álamo o hierba de *Miscanthus*, en un producto económicamente deseable tal como, por ejemplo, un biocombustible (por ejemplo, un alcohol y/o gas de hidrógeno (H₂)), polímero o producto químico a base de carbono como el ácido láctico. 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, poli-, oligo, di- y/o mono-sacáridos de hexosas y/o poli-, oligo, di- y/o monosacáridos de pentosas para producir productos químicos a base de carbono tales como etanol y/o ácido láctico.

20 Los presentes inventores han encontrado microorganismos del género *Thermoanaerobacter* que tienen una variedad de propiedades ventajosas para su uso en la conversión de oligosacáridos, disacáridos y/o monosacáridos de hexosas, y polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos y/o monosacáridos de pentosas, en particular, derivados de hidrolizados lignocelulósicos a un alto nivel de etanol y/o ácido láctico mientras se producen bajos niveles de ácido acético.

25 Es una ventaja de los microorganismos según la presente descripción que los microorganismos son capaces de convertir polisacáridos altamente complejos como xilano a altos rendimientos de productos químicos basados en carbono como etanol y/o ácido láctico.

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

35 En el presente contexto, la expresión "hidrolizado lignocelulósico" pretende designar una biomasa lignocelulósica que ha sido sometida a una etapa de pretratamiento mediante la que el material lignocelulósico ha sido al menos parcialmente separado en celulosa, hemicelulosa y lignina, teniendo así un aumento del área superficial del material. El material lignocelulósico puede derivarse normalmente de material vegetal, tal como paja, heno, desechos de jardinería, madera triturada, pieles de frutas y cáscaras de semillas.

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

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

50 Una cepa "homóloga", como se emplea en la presente memoria, se considera cualquier cepa bacteriana, que no sea significativamente diferente por medio de homología de ADN como se ha definido anteriormente y que presente propiedades fisiológicas iguales o comparables como se describe en los ejemplos de la presente memoria.

El término "mutante", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una célula bacteriana en la que el genoma, incluyendo uno o más cromosomas o ADN extracromosómico potencial, ha sido modificado en una o más posiciones, o en la que se ha añadido o eliminado ADN.

Como se emplea en la presente memoria, "mutante" u "homólogo" también significa un microorganismo derivado de las células o cepas según la presente descripción, que se alteran debido a una mutación. Una mutación es un cambio producido en el ADN celular, que puede ser espontáneo, causado por un factor ambiental o errores en la replicación del ADN, o inducido por condiciones físicas o químicas. Los procesos de mutación incluidos en esta subclase y en subclases indentadas son procesos dirigidos a la producción de cambios esencialmente aleatorios en el ADN del microorganismo incluyendo la incorporación de ADN exógeno. Todos los mutantes de los microorganismos comprenden las ventajas de ser termófilos extremos (crecimiento y fermentación a temperaturas superiores a 70 °C) y son capaces de fermentar la biomasa lignocelulósica a etanol y/o ácido láctico. En una realización ventajosa, los mutantes de los microorganismos según la presente descripción tienen en un ensayo de hibridación de ADN-ADN, una relación de ADN-ADN de al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 90 %, al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 98 %, lo más preferiblemente al menos un 99 % y lo más preferiblemente al menos un 99,9 % con una de las cepas bacterianas aisladas DIB004G, DIB087G, DIB097X, DIB101G, DIB101X, DIB103X, DIB104X y DIB107X.

El término "progenie" se refiere a un producto de reproducción bacteriana, un nuevo organismo producido por uno o más precursores.

Como se mencionó anteriormente, la biomasa lignocelulítica según la presente descripción puede ser pasto, pasto de transición, gramíneas, ballico, alpiste arundináceo, pasto mixto de pradera, *Miscanthus*, pasto Napier, residuos de azúcar, bagazo de caña de azúcar, paja de caña de azúcar, residuos agrícolas, paja de arroz, cáscaras de arroz, paja de cebada, mazorcas de maíz, paja de cereal, paja de trigo, paja de colza, paja de paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, hojarasca, hojarasca de soja, hojarasca de maíz, desechos forestales, fibra de pulpa de madera reciclada, lodos de papel, aserrín, madera dura, madera blanda, prensado de remolacha azucarera, tallo de algodón, hojas de plátano, residuos de palma aceitera y material de biomasa lignocelulósica obtenido mediante el procesamiento de plantas alimentarias. En realizaciones ventajosas, el material de biomasa lignocelulósica es madera dura y/o madera blanda, preferiblemente madera de álamo. En realizaciones ventajosas, el material de biomasa lignocelulósica es una hierba o pasto perenne, preferiblemente *Miscanthus*.

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

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

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

En realizaciones ventajosas, el material de biomasa lignocelulósica se somete a pretratamiento mecánico, termoquímico y/o bioquímico. El material de biomasa lignocelulósica podría exponerse al tratamiento con vapor. En realizaciones adicionales, el material de biomasa lignocelulósica es tratado previamente con trituración mecánica y un tratamiento subsiguiente con ácido láctico, ácido acético, ácido sulfúrico o ácido sulfuroso, o sus respectivas sales o anhídridos bajo calor y presión con o sin una liberación repentina de presión. En otra realización, el material de biomasa lignocelulósica es tratado previamente con trituración mecánica y un tratamiento subsiguiente con hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio o hidróxido de potasio con calor y presión con o sin una liberación repentina de la presión.

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

entonces en una segunda etapa con vapor de agua bajo calor y presión con o sin una liberación repentina de la presión a una temperatura de 150 a 250 °C durante un período de tiempo de entre 1 y 15 min. Para aumentar la eficacia del pretratamiento, también se puede añadir a la segunda etapa un catalizador adecuado que incluye ácido láctico, ácido acético, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio o hidróxido de potasio, o sus respectivas sales o anhídridos.

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

En realizaciones ventajosas adicionales, el hidrolizado lignocelulósico se trata después con una hidrólisis enzimática con una o más enzimas carbohidrasas apropiadas tales como celulasas, glucosidasas y/o hemicelulasas incluyendo xilanasas.

El método de pretratamiento más usado es el pretratamiento con vapor, un proceso que comprende calentar el material lignocelulósico por inyección de vapor hasta una temperatura de 130 a 230 °C con o sin la posterior liberación repentina de la presión. Antes o durante el pretratamiento con vapor, se puede añadir opcionalmente un catalizador tal como un ácido mineral u orgánico, o un agente cáustico que facilite la desintegración de la estructura de la biomasa. Los catalizadores usados frecuentemente para dicho pretratamiento incluyen ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido láctico, hidróxido de sodio (sosa cáustica), hidróxido de potasio, hidróxido de calcio (cal), amoníaco o las respectivas sales o anhídridos de cualquiera de estos agentes.

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

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

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

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

Los microorganismos según la presente descripción pueden crecer eficientemente en productos de hidrólisis de celulosa (por ejemplo, disacárido celobiosa), hexosas derivadas de celulosa (por ejemplo, glucosa), hemicelulasas no hidrolizadas como xilano, pentosas derivadas de hemicelulosa (por ejemplo, xilosa), amilosa no hidrolizada, así como álamo pretratado con vapor o *Miscanthus*. En particular, los principales productos cultivados en celobiosa, glucosa y xilosa pueden ser etanol y ácidos lácticos. El producto principal cuando se cultivó sobre sustratos de biomasa pretratados fue etanol, por ejemplo, cuando los microorganismos se cultivaron sobre madera de álamo pretratada con vapor o pasto de *Miscanthus*, el rendimiento de etanol fue alto. Los microorganismos según la

presente descripción también crecen eficientemente en celobiosa.

La celobiosa es un disacárido derivado de la condensación de dos moléculas de glucosa unidas en un enlace $\beta(1\rightarrow4)$. Puede hidrolizarse, dando glucosa. La celobiosa tiene ocho grupos alcohol libres (OH), bien un enlace éter o dos enlaces hemiacetal, que dan lugar a fuertes enlaces de hidrógeno inter- e intramoleculares. Es un tipo de hidrato de carbono de la dieta que también se encuentra en las setas. El xilano es un término genérico usado para describir una amplia variedad de polisacáridos altamente complejos que se encuentran en las paredes celulares de las plantas y algunas algas. Los xilanos son polisacáridos hechos de unidades de xilosa.

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

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

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

El material de biomasa lignocelulósica y 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 según la presente descripción que sean tolerantes a estos inhibidores.

Los microorganismos según la presente descripción son nuevas especies del género *Thermoanaerobacter* o nuevas subespecies de *Thermoanaerobacter mathranii*.

Por ejemplo, el género *Thermoanaerobacter* incluye diferentes especies de bacterias estrictamente anaeróbicas hemicelulolíticas y sacarolíticas extremadamente termófilas (temperatura óptima para el crecimiento superior a 70 °C) (Lee *et al.*, 1993). *Thermoanaerobacter mathranii* DSM 11426 es una bacteria extremadamente termófila. Tiene una temperatura óptima de entre 70 y 75 °C, y se aisló de una fuente caliente en Islandia (Larsen *et al.*, 1997). Usa una serie de azúcares incluyendo xilano como fuentes de carbono, pero no utilizó celulosa microcristalina. Los productos finales de la fermentación sobre xilosa fueron etanol, acetato, bajas cantidades de lactato, CO₂ y H₂ (Larsen *et al.*, 1997).

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

Como se mencionó anteriormente, en un aspecto, la presente descripción se refiere a una célula aislada que comprende una secuencia de ADNr 16S seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y una combinación de cualquiera de las mismas.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una célula aislada de *Thermoanaerobacter* sp. que tiene una secuencia de ADNr 16S al menos un 99, al menos un 99,3, al menos un 99,5, al menos un 99,7, al menos un 99,9, al menos un 99,99 por ciento idéntica a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8.

En una realización de la presente descripción, la célula aislada es DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp. (número de acceso DSMZ 25179), células derivadas de la misma, mutantes de la misma, una progenie, o un homólogo o mutante de DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp.

En otra realización de la presente descripción, la célula aislada es DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp. (número de

acceso DSMZ 25777), células derivadas de la misma, mutantes de la misma, una progenie, o un homólogo o mutante de DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp.

5 En otra realización de la presente descripción, la célula aislada es DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp. (número de acceso DSMZ 25308), células derivadas de la misma, mutantes de la misma, una progenie, o un homólogo o mutante de DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp.

En otra realización de la presente descripción, la célula aislada es DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp. (número de acceso DSMZ 25180), células derivadas de la misma, mutantes de la misma, una progenie, o un homólogo o mutante de DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp.

10 En otra realización de la presente descripción, la célula aislada es DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp. (número de acceso DSMZ 25181), células derivadas de la misma, mutantes de la misma, una progenie, o un homólogo o mutante de DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp.

En otra realización de la presente descripción, la célula aislada es DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp. (número de acceso DSMZ 25776), células derivadas de la misma, mutantes de la misma, una progenie, o un homólogo o mutante de DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp.

15 En otra realización de la presente descripción, la célula aislada es DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp. (número de acceso DSMZ 25778), células derivadas de la misma, mutantes de la misma, una progenie, o un homólogo o mutante de DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp.

20 En otra realización de la presente descripción, la célula aislada es DIB107X de *Thermoanaerobacter* sp. (número de acceso DSMZ 25779), células derivadas de la misma, mutantes de la misma, una progenie, o un homólogo o mutante de DIB107X de *Thermoanaerobacter* sp.

La descripción se basa en las cepas bacterianas aisladas de *Thermoanaerobacter* sp. enumeradas en la Tabla 1 que contienen secuencias de ADNr 16S que son un 100 por cien y/o un 99,99 por cien idénticas a las secuencias de la lista respectivamente.

Tabla 1

Género	Especie	Nombre	Número de acceso DSMZ	Fecha de la deposición	SEQ ID NO del ADNr 16S
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB004G	DSM 25179	15.09.2011	1
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB087G	DSM 25777	15.03.2012	2
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB097X	DSM 25308	27.10.2011	3
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB101G	DIB 25180	15.09.2011	4
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB101X	DSM 25181	15.09.2011	5
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB103X	DSM 25776	15.03.2012	6
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB104X	DSM 25778	15.03.2012	7
<i>Thermoanaerobacter</i>	sp.	DIB107X	DSM 25779	15.03.2012	8

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

30 Como es evidente a partir de lo que se expone a continuación, 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 los mutantes derivados que tienen características mejoradas. Las características deseables incluyen un mayor intervalo 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. Los métodos adecuados para la mutación de cepas bacterianas y la selección de mutantes deseados se describen en "Functional analysis of Bacterial genes: A practical Manual", editado por W. Schumann, S. D. Ehrlich y N. Ogasawara, 2001.

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

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

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

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

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

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

Las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. según la presente descripción tienen varias características muy ventajosas necesarias para la conversión del material de biomasa lignocelulósica. Así pues, estas cepas de base poseen toda la maquinaria genética para la conversión de ambos azúcares de pentosa y hexosa en diversos productos de fermentación tales como etanol y ácido láctico. Como resultará evidente a partir de los siguientes ejemplos, el examen de la secuencia completa del ADNr 16S mostró que las cepas relacionadas con DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp., DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp. y DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp. pueden estar relacionadas con *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, aunque las secuencias de ADNr 16S pueden situarlas claramente en subespecies separadas o incluso especies diferentes. La cepa DIB107X de *Thermoanaerobacter* sp. puede estar relacionada con *Thermoanaerobacter thermocopriae*, aunque las secuencias de ADNr 16S las colocan claramente en subespecies separadas o incluso diferentes especies. Las cepas DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp., DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp., DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp. y DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp. pueden estar relacionadas con *Thermoanaerobacter mathranii*, aunque las secuencias de ADNr 16S las colocan claramente en subespecies separadas o incluso diferentes especies.

60 Es una gran ventaja de las cepas de *Thermoanaerobacter* sp. de acuerdo con la presente descripción que son

xilanolíticas y sacarolíticas (fermentan hemicelulosas, p. ej., xilano, hexosas y pentosas a etanol, lactato y pequeñas cantidades de acetato).

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

5 a) cualquier *Thermoanaerobacter* sp. enumerado en la Tabla 1, depositados bajo su número de acceso y fecha de deposición indicados respectivamente, conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) por DIREVO Industrial Biotechnology GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Colonia, Alemania (DE); o

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

c) un homólogo o mutante de cualquiera de las respectivas cepas de *Thermoanaerobacter* sp.

15 Todas las cepas *Thermoanaerobacter* sp. que figuran en la Tabla 1 pertenecen al género *Thermoanaerobacter* y son bacterias Gram-positivas estrictamente anaeróbicas extremadamente termófilas (crecimiento a temperaturas superiores a 70 °C), xilanolíticas, amilolíticas y sacarolíticas. Las células son varillas rectas de 0,3-0,4 µm por 2,0-6,0 µm, que se producen tanto individualmente como en parejas. Estas cepas crecen en diversos azúcares como sustrato, incluyendo almidón, xilano, xilosa, celobiosa y glucosa.

Los principales productos de fermentación de estos sustratos son etanol y lactato. También se forman bajas cantidades de acetato.

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

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

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

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

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

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 celda inmovilizada, un reactor de lecho fluidizado o un biorreactor de membrana.

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

ácido succínico, ácido butírico, ácido fórmico y acetona según la descripción.

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

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

Métodos y ejemplos

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

Ejemplo 1: Aislamiento y cultivo

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

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

Medio básico		
NH ₄ Cl	1,0	g
NaCl	0,5	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05	g
NaHCO ₃	0,5	g
K ₂ HPO ₄	1,5	g
KH ₂ PO ₄	3,0	g
Extracto de levadura (bacto, BD)	0,5	g
Celobiosa	5,0	g
Vitaminas (véase más abajo)	1,0	ml
Elementos traza (véase más abajo)	0,5	ml
Resazurina	1,0	mg
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,75	g
Agua destilada	1000,0	ml
Solución madre de elementos traza		
NiCl ₂ x 6H ₂ O	2	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	1	g
Citrato de NH ₄ Fe (III), marrón, Fe al 21,5 %	10	g
MnSO ₄ x H ₂ O	5	g

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

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

10 Los sustratos de azúcar solubles (xilosa, celobiosa, glucosa) como se especifica para cada uno de los experimentos se añaden filtrados en condiciones estériles tras su esterilización por el autoclave. El xilano se esteriliza en autoclave con el medio. Tras la esterilización por autoclave, se inoculan los cultivos mediante la inyección de un cultivo de siembra a través del septo de sellado y se inoculan en una incubadora a 72 °C durante el tiempo indicado.

Ejemplo 2: HPLC

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

15 Ejemplo 3: Análisis filogenético de genes de ADN_r 16S

20 Se aisló ADN genómico de cultivos desarrollados como se describió anteriormente y se amplificó ADN_r 16S mediante PCR usando 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) como cebador directo y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) como cebador inverso. Se secuenciaron los productos resultantes y se analizaron las secuencias usando el software Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation). Se usó la base de datos NCBI para los procedimientos BLAST.

La alineación se llevó a cabo usando ClustalW (Chenna *et al.*, 2003) y el árbol filogenético se construyó usando el software MEGA4 (Kumar *et al.*, 2001). El árbol para todas las cepas enumeradas en la Tabla 1 se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 4: Producción de etanol y lactato en diferentes sustratos

- 5 Se realizaron experimentos de crecimiento y fermentación de celobiosa, glucosa, xilano y xilosa, así como de madera de álamo pretratada, pasto de *Miscanthus*, bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, tallos de maíz y DDGS, así como en papel de desecho no pretratado, mediante el cultivo en tubos de 16 ml sellados con 8 ml de medio descrito en el Ejemplo 1. Todas las cepas crecieron bien en estos sustratos (Figuras 10 y 11), a excepción de las cepas DIB004G, DIB087G y DIB101G, que no crecieron sobre xilano. No se detectó crecimiento en la celulosa. El principal producto de fermentación fue etanol seguido de lactato. Solo se formaron pequeñas cantidades de acetato (Figuras 10 y 11). Por el contrario, la cepa A3 de la bacteria termófila *Thermoanaerobacter mathranii* (DSM 11426) (Larsen *et al.*, 1997) productora de etanol produjo cantidades inferiores de etanol, así como cantidades superiores de lactato y acetato.

Ejemplo 5: Fermentación

- 15 Se realizaron experimentos en lotes con todas las cepas, p. ej., DIB004G, mediante el cultivo en el medio descrito anteriormente con la adición del sustrato indicado respectivamente, p. ej., de pasto de *Miscanthus* a 20 g/l pretratado con un método adecuado seleccionado entre los descritos anteriormente, que comprende calentar en presencia de ácido diluido seguido de la liberación repentina de presión.

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

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

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

- 25 Los resultados de la formación del producto durante la fermentación de DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp. en pasto de *Miscanthus* pretratado se muestran en la Figura 12. Los resultados para la formación del producto durante una fermentación de DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp. en semillas de maíz molido no pretratadas se muestra en la Figura 13.

Lista de referencias adicionales

- 30 Lee Y-E, Jain M. K., Lee c. Lowe S. E., Zeikus J. G. (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 transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*". *Int J Syst Bacteriol* 43:41-51.
- 35 Larsen L., Nielsen P., Ahring B. K. (1997) "*Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Iceland". *Arch Microbiol* 168:114-119.

Hungate R. E. (1969) "A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology*". Eds. Norris J. R. y Ribbons D. W., pág. 118-132. Nueva York: Academic Press.

- 40 Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T. J, Higgins D. G, Thompson J. D.. (2003) "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs". *Nucleic Acids Res.* 13:3497-3500.

Kumar S., Tamura K., Jakobsen I. B., Nei M. (2001) "MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software". *Bioinformatics.* 17:1244-1245.

Patente de EE.UU. n.º US 6.555.350

- 45 Solicitud de patente internacional WO 2007/134607

Patente de EE.UU. n.º US 6.555.350

Solicitud de patente internacional WO 2007/134607.

Listado de secuencias

<110> DIREVO Industriell Biotechnology GmbH

5 <120> BACTERIAS EXTREMADAMENTE TERMÓFILAS VERSÁTILES PARA LA CONVERSIÓN DE BIOMASA

<130> DIR-PA15-PCT

10 <150> US61/669,998
<151> 10-07-2012

<150> EP12175684
<151> 10-07-2012

15 <150> EP11008857
<151> 07-11-2011

<150> US61/556,448
<151> 07-11-2011

20 <150> US61/544,831
<151> 07-10-2011

<150> EP11008155
<151> 07-10-2011

25 <160> 10

<170> BiSSAP 1.2

30 <210> 1
<211> 1422
<212> DNA
<213> Thermoanaerobacter sp.

35 <220>
<221> source
<222> 1..1422
<223> /organismo="Thermoanaerobacter sp." /nota="secuencia de consenso ADNr 16S para Thermoanaerobacter
40 sp. DIB004G " /tipo_mol="AND sin asignar"

<400> 1

ggttgggtca cgggcttcgg gtgtcgcagg ctctcgtggt gtgacgggcg gtgtgtataa 60

ggccccggaa cgtattcacc gggcatgct gatccgcgat tactagcga tccgacttca 120

tgcaggcgag ttgcagcctg caatccgaac ttggaccggc tttttgggat tcgctccgcc 180

tcacggcttc gcttccctct gtaccggcca ttgtagcacg tgtgtggccc agggcattta 240

gggcatgatg atttgacgtc atccccacct tcctccgtgt cctccacggc agtccctcta 300

gagtgccggg cttaccgctt ggcaactaga ggcagggggt ggcctcgttg cgggacttaa 360

cccaacatct cacgacacga gctgacgaca accatgcacc acctgtgcag gctccttacc 420

tcccggtaag gtcgctcccc tttcggttcg ctactacctg catgtcaagc cctggtaagg 480

ttcttcgctg tcttcgcaat taaaccacat gctccaccgc ttgtgcgggc ccccgtaaat 540

tcctttgagt ttcaaccttg cggccgtact ccccagggcg ggtacttatt gcgttcgcta 600

cggcacggaa cgcttccgcg ccccacacct agtaccatc gtttacagcg tggactacca 660

gggtatctaa tcctgttcgc tccccacgct ttcgcgcctc agcgtcaggg ccagtccaga 720

45

ES 2 644 476 T3

gagtcgcctt cgccactggc attcctcccg atatctacgc atttcaccgc tacaccggga 780
 attccactcc cctctcctgc cctctagcca atcagtttca gatgctaccc cccggttgag 840
 cccgggtcctt ttacacctga cttgattgac cgcctacgcg ccctttacgc ccagtaattc 900
 cggacaacgc tcgcccccta cgtcttaccg cggctgctgg cacgtagtta gccggggcctt 960
 tcgtgtggta ccgtcatccc ttcttccac actaacgggg tttaacaacc gaaggccttc 1020
 ctccccacg cggcgtcgtt gggtcaggct tccgccatt gcccaagatt ccccactgct 1080
 gcctcccgta ggagtctggg ccgtgtctca gtcccagtgt ggccgtccac cctctcaggc 1140
 cggctacccg tcgtgcctt ggtaggccgt taccctacca actagctgat gggacgcggg 1200
 cccatcctta agcggtagct tgcgcttccc tttcctcct ataggatgcc ctataaggag 1260
 cttatccagt attaccaccc ctttcgaggt gctatcccgg tcttaagggt aggttgccca 1320
 cgcgttactc acccgtccgc cgctatccgc cacccaacta cgttgagtgc cggaccgctc 1380
 gactgcatgt gtaggcacg ccgccagcgt tcgtcctgag cc 1422

<210> 2

<211> 1659

5 <212> ADN

<213> Thermoanaerobacter sp.

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1659

<223> /organismo="Thermoanaerobacter sp." /nota="secuencia de consenso ADNr 16S para Thermoanaerobacter sp. DIB087G " /tipo_mol="AND sin asignar"

<400> 2

15

actcaagtgg gcaacgtttt ttctcttcat cacgtttcta acatgcccac ttgagtgccg 60
 ggttgggtca ccggcttcgg gtgttgacga ctctcgtggg gtgacgggag gtgtgtacaa 120
 ggccccggaa cgtattcacc gcggcatgct gatccgcgat tactagcgat tccgacttca 180
 tgcaggcgag ttgcagcctg caatccgaac ttggaccggc tttttggggc ccgctccaga 240
 tcgctccttc gcctccctct gtaccggcca ttgtagcacg tgtgtggccc agggcatata 300
 gggcatgatg atttgacgtc atccccacct tccctcogtgt 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 tcatgcccac ttgagtgccg 600
 ggtcgcctac ctttcggctc gctactacct gcatgtcaag ccctggtaag gttcttcgag 660
 ttgcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg cccccgtaa ttcctttgag 720

ES 2 644 476 T3

tttcaacctt gcggccgtac tccccaggcg gggacttat tgcgttaact acggcacgga 780
atgcttccgc atcccacacc tagtaccat cgtttacggc gtggactacc agggatatcta 840
atcctgtttg ctccccacgc tttcgcgcct cagcgtcagg gtcagtccag agagtgcct 900
tcgccactgg tattcctccc gatatacag catttcaccg ctacaccggg aattccacte 960
ccctctcctg ccctctagcc acccagtttc atgtgcatcc cccgggttga gcccggttt 1020
tttacacctg acttaagtgg ccgcctacgc gccctttacg cccagtaatt ccggacaacg 1080
ctcgccccct acgtcttacc gcggctgctg gcacgtagtt agccggggct ttcgtgtggt 1140
accgtcatct attcttccca cactatcgag ctttacgacc cgaaggcctt cttcgctcac 1200
gcggcgtcgc tgcgtcaggc tttcgcctat tgcgcaagat tccccactgc tgcctcccgt 1260
aggagtctgg gccgtgtctc agtcccagtg tggccgacca ccctctcagg ccggtaccc 1320
gtcgtcgcct tggtagggcg ttaccctacc aactagctga tgggacgagg gcccatcctt 1380
aagcggtagc ttcgctacc ttccctctc ataggatgcc ctacaaggag cttatccagt 1440
attagcacc ctttcgagggt gttatcccgg tcttaagggt aggttgcca cgcgttactc 1500
accgctcgc cgctatccgg cactcaactc cgtgcttacc ttactttgca ccacttttat 1560
tactttcttc ttctactata cttcctccc ctttaagtaag cacttagttg agtgccggac 1620
cgctcgactt gcatgtgta ggcacgccgc cagcgttcg 1659

<210> 3

<211> 1436

5 <212> ADN

<213> Thermoanaerobacter sp.

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1436

<223> /organismo="Thermoanaerobacter sp." /nota="secuencia de consenso ADNr 16S para Thermoanaerobacter sp. DIB097X " /tipo_mol="AND sin asignar"

<400> 3

15

cccggttggg tcaccggcct cgggtgtcgc aggtctcgt ggtgtgacgg gcggtgtgta 60
caaggcccgg gaacgtattc accgcggcat gctgatccgc gattactagc gattccgact 120
tcatgcaggc gagttgcagc ctgcaatcgg aacttggacc ggctttttgg gattcgtcc 180
gcctcggggc ttcgctcccc tctgtaccgg ccattgtagc acgtgtgtgg cccagggcat 240
ataggcatg atgatttgac gtcatcccca cttcctcgg tgcctccac ggcagtcccc 300
ctagagtgcc cggcttacc gctggcaact agaggcagg gttgctcgc ttgcgggact 360
taaccaaca tctcagaca cgagctgacg acaaccatgc accacctgtg caggctcctt 420
acctcccggg aaggtcgtc ccctttcggg tcgctactac ctgcatgtca agccctggta 480

ES 2 644 476 T3

aggttcttcg cgttgcttcg aattaaacca catgctccac cgcttggtgc ggccccgctc 540
aattcctttg agtttcaacc ttgcggccgt actccccagg cggggtaactt attgcgttcg 600
ctacggcacg gaacgcttcc gcgccccaca cctagtacc ctcgctttaca gcgtggacta 660
ccagggtatc taatcctggt cgctccccac gctttcgcgc ctcagcgtca gggccagtcc 720
agagagtgc cttcgccact ggtattcctc ccgatatcta cgcatttcac cgctacaccg 780
ggaattccac tcccctctcc tgccctctag ccaatcagtt tcagatgcta cccccgggtt 840
gagccccggg cttttacacc tgacttgatt gaccgcctac ggcgccctta cggccagtaa 900
ttccggacaa cgctcgcccc ctacgtctta ccgcggctgc tggcacgtag ttagccgggg 960
ctttcgtgtg gtaccgctcat cccttcttcc cacactaacg gggtttaciaa cccgaaggcc 1020
ttcctcccc acgcggcgctc gctgggtcag gcttcgcgcc attgcccaag attccccact 1080
gctgcctccc gtaggagtct gggccgtgctc tcagtcccag tgtggccgac caccctctca 1140
ggcccgctac ccgtcgtcgc cttggtaggc cgttacccta ccaactagct gatgggacgc 1200
gggccccatc ttaagcggta gcttgccct ccctttcctc cctataggat gccctataag 1260
gagcttatcc agtattacca ccccttctga ggtgctatcc cggctctaag ggtaggttgc 1320
ccacgcgta ctcaccgctc cgccgctatc cgccacccaa ctacgttgag tgccggaccg 1380
ctcgacttgc atgtgttagg cagcccgcca gcgttcgtcc tgagccatga tcaaac 1436

<210> 4

<211> 1080

5 <212> ADN

<213> Thermoanaerobacter sp.

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1080

<223> /organismo="Thermoanaerobacter sp." /nota="secuencia de consendo ADNr 16S para Thermoanaerobacter sp. DIB101G " /tipo_mol="AND sin asignar"

<400> 4

15

gctcaggacg aacgctggcg gcgtgcctaa cacatgcaag togagcggtc cggcactcaa 60
ctaagtgctt acttaagggg aaggaagtat agtagaagaa gaaggtaata aaagtgatgc 120
aaagtaaggt aagcacggag ttgagtgcgg gatagcggcg gacgggtgag taacgcgtgg 180
gcaacctacc cttagaccg ggataacacc tcgaaagggg tgctaatact ggataagctc 240
ctttagggc atcctatgag gagggaaggt agcgggaagct accgcttaag gatgggcccc 300
cgtcccatca gctagttggt agggtaacgg cctaccaag cgcgcgacgg tagccggcct 360
gagaggggtg tcggccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca 420
gtggggaatc ttgcgcaatg ggcgaaagcc tgacgcagcg acgccgcgtg agcgaagaag 480

ES 2 644 476 T3

gccttcgggt cgtaaagctc gatagtgtgg gaagaataga tgacggtacc acacgaaagc 540
cccgggtaac tacgtgccag cagcccggtt aagacgtagg gggcgagcgt tgtccggaat 600
tactgggctt aaagggcgcg taggcggcca cttaaagtcag gtgtaaaaaa cccgggctca 660
acccggggga tgcacatgaa actgggtggc tagagggcag gagaggggag tgaattccc 720
gggtgtagcgg tgaatgctg agatatcggg aggaatacca gtggcgaagg cgactctctg 780
gactgacctt gacgtgagc cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag atacctcgtt 840
agtccacgcc gtaaaccgat ggtactaggt gtgggatgcg gaagcattcc gtgccgtagt 900
taacgcaata agtaccocgc ctggggagta cggccgcaag gttgaaactc aaaggaattg 960
acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt 1020
accaggcctt gacatgcagc tagtagcagc ccgaaaggtg agcgaccocg cactcaagtg 1080

<210> 5

<211> 1451

5 <212> ADN

<213> Thermoanaerobacter sp.

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1451

<223> /organismo="Thermoanaerobacter sp." /nota="secuencia de consenso ADNr 16S para Thermoanaerobacter sp. DIB101X " /tipo_mol="AND sin asignar"

<400> 5

15 gccccacttt cgacggctcc ctccctcccg gttgggtcac cggcttcggg tgtcgcaggc 60
tctcgtgggtg tgacggggcgg tgtgtacaag gcccgggaac gtattcacccg cggcatgctg 120
atccgcgatt actagcgatt ccgacttcat gcagggcagc tgcagcctgc aatccgaact 180
tggaccggctt ttttgggatt cgctccgcct cgcggcttcg cttccctctg taccggccat 240
tgtagcacgt gtgtggccca gggcatatag ggcgatgaga tttgacgtca tccccacctt 300
cctccgtgtc ctccacggca gtccctctag agtgcccggc ttaccgcctg gcaactagag 360
gcagggggtg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacaa 420
ccatgcacca cctgtgcagg ctccctacct cccggtaagg tcgctcccct ttcggttcgc 480
tactacctgc atgtcaagcc ctggtaaggc tcttcgcggt gcttcgaatt aaaccacatg 540
ctccaccgct tgtgogggcc cccgtcaatt cctttgagtt tcaaccttgc ggccgtactc 600
cccaggcggg gtacttattg cgttcgctac ggcacggaac gcttcgcgcg cccacaccta 660
gtaccatcgc tttacagcgt ggactaccag ggtatctaact cctgttcgct ccccacgctt 720
tcgcccctca gcgtcagggc cagtccagag agtcgccttc gccactggta ttccctccga 780
tatctacgca tttcaccgct acaccgggaa ttccactccc ctctcctgcc ctctagccaa 840

ES 2 644 476 T3

tcagtttcag atgctacccc egggttgagc cggggtcttt tacacctgac ttgattgacc 900
gcctacgcgc cttttacgcc cagtaattcc ggacaacgct cgccccctac gtcttaccgc 960
ggctgctggc acgtagttag ccggggcttt cgtgtggtac cgtcatccct tcttcccaca 1020
ctaacggggt ttacaacccg aaggccttcc tccccacgc ggcgtcgtg ggtcaggctt 1080
ccgcccattg cccaagattc cccactgctg cctcccgtag gagtctgggc cgtgtctcag 1140
tcccagtgtg gccgaccacc ctctcaggcc ggctaccggt cgtcgccttg gtaggcggtt 1200
accctaccaa ctagctgatg ggacgcgggc ccatccttaa gcggtagctt ggcctccct 1260
ttcctcccta taggatgccc tataaggagc ttatccagta ttaccacccc tttcgaggtg 1320
ctatcccgtt ctaagggta ggttgcccac gcgttactca cccgtccgcc gctatccgcc 1380
acccaactac gttgagtgcc ggaccgctcg acttgcatgt gttaggcacg ccgccagcgt 1440
tcgtcctgag c 1451

<210> 6

<211> 1465

5 <212> ADN

<213> Thermoanaerobacter sp.

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1465

<223> /organismo="Thermoanaerobacter sp." /nota="secuencia de consenso ADNr 16S para Thermoanaerobacter sp. DIB103X " /tipo_mol="AND sin asignar"

<400> 6

15

ttcaccccaa tcacctgccc caccttcgac ggctccctcc tccccggttg ggtcacccggc 60
ttcgggtgtc gcaggctctc gtggtgtgac gggcgggtg tacaaggccc ggaacgtat 120
tcaccgcggc atgctgatcc gcgattacta gcgattccga cttcatgcag gcgagttgca 180
gcctgcaatc cgaacttggc ccggcttttt gggattcgtt ccgcctcgcg gcttcgctcc 240
cctctgtacc ggccattgta gcacgtgtgt ggcccagggc atatagggca tgatgatttg 300
acgtcatccc caccttcctc cgtgtcctcc acggcagtc ccttagagtg cccggettac 360
ccgctggcaa ctagaggcag gggttgcgct cgttgccgga cttaaccaa catctcacga 420
cacgagctga cgacaacat gcaccacctg tgcaggctcc ttacctcccg gtaaggtcgc 480
tcccctttcg gttcgctact acctgcatgt caagccctgg taaggttctt cgcgttgctt 540
cgaattaaac cacatgctcc accgcttgtg cgggcccccg tcaattcctt tgagtttcaa 600
ccttgcggcc gtactcccca ggcgggttac ttattgcggt cgctacggca cggaacgctt 660
ccgcgcccc aacctagtag ccatcgttta cagcgtggac taccagggta tctaactctg 720
ttcgtcccc acgctttcgc gcctcagcgt cagggccagt ccagagagtc gccttcgcca 780

ES 2 644 476 T3

ctggtattcc tcccgatata tacgcatttc accgctacac cgggaattcc actcccctct 840
 cctgcccctct agccaatcag tttcagatgc taccocccggg ttgagcccgg gtctttttaca 900
 cctgacttga ttgaccgcct acgcgccctt tacgcccagt aattccggac aacgctcgcc 960
 ccctacgtct taccgcggct gctggcacgt agtagccgg ggctttcgtg tggtaaccgtc 1020
 atcccttctt cccacactaa cggggtttac aaccocgaag ccttcctccc ccacgcggcg 1080
 tcgctgggtc aggcttccgc ccattgccca agattcccca ctgctgcctc ccgtaggagt 1140
 ctggggcgtg tctcagtccc agtgtggccg accaccctct caggccggct acccgtcgtc 1200
 gccttggtag gccgttacc taccaactag ctgatgggac gggggcccat ccttaagcgg 1260
 tagcttgogc ctccctttcc tcctataggt atgcctata aggagcttat ccagtattac 1320
 caccoccttc gaggtgctat cccggtotta agggtaggtt gccacgcgt tactcaccog 1380
 tccgccgcta tccgccacc aactacgttg agtgccggac cgctcgactt gcatgtgtta 1440
 ggacgcgcgc cagcgttcgt cctga 1465

<210> 7

<211> 1665

5 <212> ADN

<213> Thermoanaerobacter sp.

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1665

<223> /organismo="Thermoanaerobacter sp." /nota="secuencia de consenso ADNr 16S para Thermoanaerobacter sp. DIB104X " /tipo_mol="AND sin asignar"

<400> 7

15

actcaagtgg gcacgttttt ttctcttcat cacgtttcta acatgcccac ttgagtgccg 60
 ggttgggtca ccggcttcgg gtgttgacaga ctctcgtggt gtgacgggag gtgtgtataa 120
 ggccccggaa cgtattcacc gcggcatgct gatccgcgat tactagcgtat tccgacttca 180
 tgcaggcgag ttgcagcctg caatccgaac ttggaccggc 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 tcatgcccac ttgagtgccg 600
 ggtcgcctac ctttcggctc gctactacct gcatgtcaag ccctggtaag gttcttcgag 660
 ttgcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg cccccgtaa ttcctttgag 720

ES 2 644 476 T3

tttcaacctt gcggccgtac tccccaggcg gggacttat tgcgttaact acggcacgga 780
atgcttcogc atcccacacc tagtaccocat cgtttacggc gtggactacc agggatatcta 840
atcctgtttg ctccccacgc tttcgcgcct cagcgtcagg gtcagtccag agagtgcct 900
tcgccactgg tattcctccc gatatctaag catttcaccg ctacaccggg aattccactc 960
ccctctcctg ccctctagcc acccagtttc atgtgcatcc cccgggttga gcccggttt 1020
tttacacctg acttaagtgg ccgcctacgc gccctttacg cccagtaatt ccggacaacg 1080
ctcgccccct acgtcttacc gcggctgctg gcacgtagtt agccggggct ttcgtgtgg 1140
accgtcatct attcttccca cactatcgag ctttacgacc cgaaggcctt cttcgctcac 1200
gcggcgtogc tgcgtcaggc tttcgcccat tgcgcaagat tccccactgc tgcctcccgt 1260
aggagtctgg gccgtgtctc agtcccagtg tggccgacca ccctctcagg ccggctaccc 1320
gtcgtcgctt tggtaggccg ttaccctacc aactagctga tgggacgcgg gcccatcctt 1380
aagcggtagc ttccgctacc ttccctcctc ataggatgcc ctacaaggag cttatccagt 1440
attagcacc ctttcgaggt gttatcccg tcttaagggt aggttgccca cgcgttactc 1500
accgctcogc cgctatccgg cactcaactc cgtgcttacc ttactttgca ccacttttat 1560
tactttcttc ttctactata cttccttccc ctttaagtaag cacttagttg agtgccggac 1620
cgctcgactt gcatgtgta ggcacgccgc cagcgttcgt cctga 1665

<210> 8

<211> 1105

5 <212> ADN

<213> Thermoanaerobacter sp.

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1105

<223> /organismo="Thermoanaerobacter sp." /nota="secuencia de consenso ADNr 16S para Thermoanaerobacter sp. DIB107X " /tipo_mol="AND sin asignar"

<400> 8

15

tcaggacgaa cgctggcggc gtgcctaaca catgcaagtc gagcggcccg gcactcaacg 60
tagttgagtg gcggatagcg gcggacgggt gagtaacgcg tgggcaacct acccttaaga 120
ccgggatagc acctogaaag ggggtgtaat actggataag ctcttatag ggcacatctat 180
agggaggaaa ggaagcgcga agctaccgct taaggatggg cccgcgtccc atcagctagt 240
tggtagggta acggcctacc aaggckacga cgggtagccg gcctgagagg gtggtcggcc 300
aactggggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatcttgggc 360
aatggcgga agcctgacct agcgacccg cgtgggggag gaaggccttc gggttgtaaa 420
ccccgttagt gtgggaagaa gggatgacgg taccacacga aagccccggc taactacgtg 480

ES 2 644 476 T3

ccagcagccg cgtaagacg tagggggcga gcgttgccg gaattactgg gcgtaaaggg 540
 cgcgtaggcg gtcaatcaag tcaggtgtaa aagaccggg ctcaaccggg ggtagcacc 600
 tgaaactggt tggctagagg gcaggagagg ggagtggaat tcccgggtga gcggtgaaat 660
 gcgtagatat cgggaggaat accagtggcg aaggcgactc tctggactgg ccctgacgct 720
 gaggcgcgaa agcgtgggga gcgaacagga ttagatacc tggtagtcca cgctgtaaac 780
 gatgggtact aggtgtgggg cgcggaagcg ttccgtgccg tagcgaacgc aataagtacc 840
 ccgcctgggg agtacggccg caaggtgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcaaa 900
 gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg gcttgacatg 960
 caggtggtag cgaaccgaaa ggtgagcgc cttaccggga ggtaaggagc ctgcacaggt 1020
 ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc 1080
 aaccctgcc tctagttgcc agcgg 1105

<210> 9
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..20
 <223> /organismo="Secuencia Artificial" /nota="cebador directo 27F" /ripo_mol="ADN sin asignar"

<400> 9

15 agagttgat cmtggctcag 20

<210> 10
 <211> 19
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 25 <222> 1..19
 <223> /organismo=" Secuencia Artificial" /nota="cebador inverso 1492R" /tipo_mol="ADN sin asignar"

<400> 10

30 ggttacctg ttacgact 19

REIVINDICACIONES

1. Una célula de *Thermoanaerobacter* sp. aislada capaz de crecer y producir un producto químico a base de carbono a una temperatura superior a 70 °C que comprende una secuencia de ADNr 16S de SEQ ID NO:1, y en donde la célula es DIB004G depositada con el número de acceso DSMZ 25179.
- 5 2. La célula aislada según la reivindicación 1, en donde la célula es capaz de producir un producto químico a base de carbono seleccionado del grupo que consiste en ácidos carboxílicos como ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, ácido butírico y ácido fórmico, o sales o ésteres de los mismos, y alcoholes como etanol, butanol, propanol, metanol, propanodiol y butanodiol.
- 10 3. La célula aislada según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es capaz de crecer a una temperatura superior a 70 °C, en particular, entre 70 y 90 °C, en particular, entre 70 y 85 °C, en particular, a una temperatura de entre 70 °C y 75 °C.

FIGURA 1

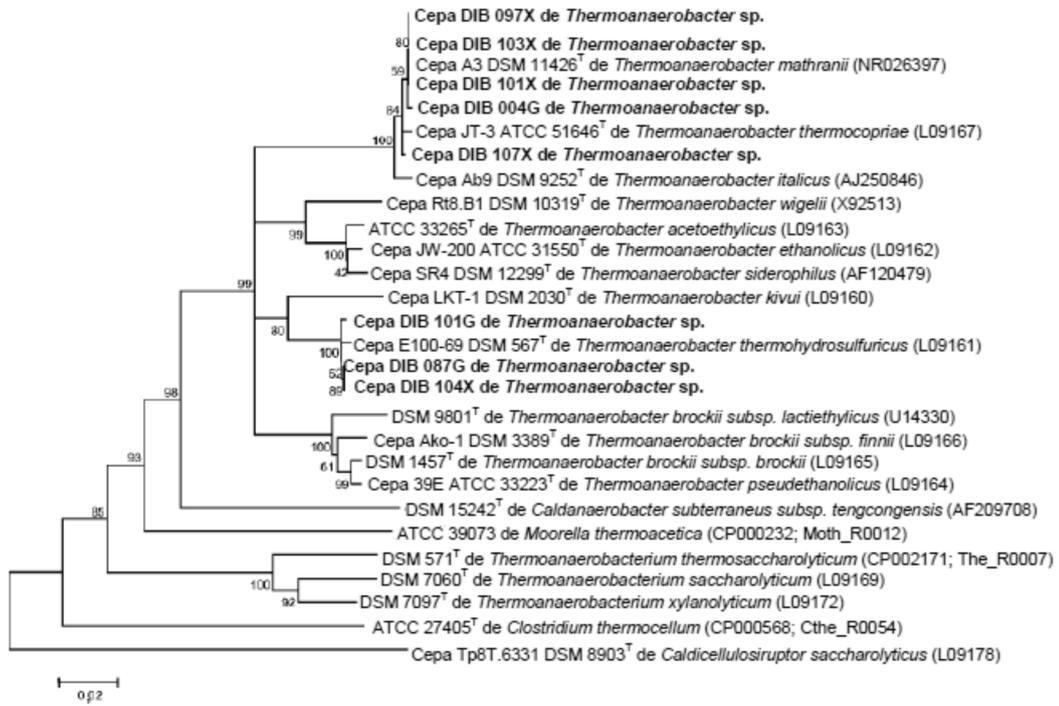


FIGURA 2

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp. (SEQ ID NO:1)

ggttgggtca	ocggcttcgg	gtgtcgcag	ctctcgtggt	gtgacgggcg	gtgtgtacaa	60
ggcccgggaa	cgtattcacc	goggcattgt	gatccgcgat	tactagcgat	tccgacttca	120
tgcaggcgag	ttgcagcctg	caatccgaac	ttggaccggc	tttttgggat	tcgctccgcc	180
tcacggcttc	gcttccctct	gtaccggcca	ttgtagcacg	tgtgtggccc	agggcattta	240
gggcatgatg	at ttgacgtc	atccccacct	tcctccggtg	cctccaaggc	agtccctcta	300
gagtgcctcg	cttaccgct	ggcaactaga	ggcaggggtt	gcgctcgttg	cgggacttaa	360
cccacatct	cacgacacga	gctgacgaca	accatgcacc	acctgtgcag	gctccttacc	420
tcccggtaag	gtcgtcctcc	tttcggttcg	ctactacctg	catgtcaagc	cctggtaagg	480
ttcttcgctg	tgcttcgaat	taaaccacat	gctccaaccg	ttgtgcgggc	ccccgtcaat	540
tcctttgagt	ttcaaccttg	cggccgtact	ccccaggcgg	ggtaactatt	gogttcgcta	600
cggcacggaa	cgcttccggg	ccccacacct	agtaccatc	gtttacagcg	tggactacca	660
gggtatctaa	tcctgttcgc	tcccacgct	ttcgcgctc	agcgtcaggg	ccagtccaga	720
gagtgcctt	cgccactggg	attcctcccg	atatctacgc	at ttcaccgc	tacaccggga	780
attccactcc	cctctcctgc	cctctagcca	atcagtttca	gatgctaccc	cccggttgag	840
cccgggtcct	ttacacctga	cttgattgac	cgcctacggc	ccctttacgc	ccagtaattc	900
cggacaacgc	tcgcccccta	cgtcttaccg	cggctgctgg	cacgtagtta	gccggggctt	960
tcgtgtggta	ccgtcatccc	ttcttcccac	actaacgggg	tttacaacc	gaaggccttc	1020
ctccccacg	ggcgctcgt	gggtcaggct	tcgcgccatt	gcccagatt	ccccactgct	1080
gctcctcgta	ggagtctggg	cogtgtctca	gtcccagtgt	ggccgtccac	cctctcaggc	1140
cggctaccgg	tcgtcgcctt	ggtaggccgt	tacctacca	actagctgat	gggacgegg	1200
ccatcctta	agcggtagct	tcgcttccc	tttctccct	ataggatgcc	ctataaggag	1260
cttatccagt	attaccaacc	ctttcgaggt	gctatcccgg	tcttaagggt	aggttgcca	1320
cgcgttactc	accgctccgc	cgctatccgc	cacccaacta	cgttgagtgc	cggaccgctc	1380
gactgcatgt	gtaggcacg	ccgccagcgt	tcgtcctgag	cc		1422

FIGURA 3

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB087G de *Thermoanaerobacter* sp. (SEQ ID NO:2)

ACTCAAGTGG	GCACGTTTTT	TTCTCTTCAT	CACGTTTTCTA	ACATGCCAC	TTGAGTGCCG	60
GGTTGGGTCA	CCGGCTTCGG	GTGTTGCAGA	CTCTCGTGGT	GTGACGGGCG	GTGTGTACAA	120
GGCCCGGGAA	CGTATTCACC	GCGGCATGCT	GATCCGCGAT	TACTAGCGAT	TCCGACTTCA	180
TGCAGGCGAG	TTGCAGCCTG	CAATCCGAAC	TTGGACCGGC	TTTTTGGGGT	CCGCTCCAGA	240
TCGCTCCTTC	GCCTCCCTCT	GTACCGGCCA	TTGTAGCACG	TGTGTGGCCC	AGGGCATATA	300
GGGCATGATG	ATTTGACGTC	ATCCCCAACC	TCCTCCGTGT	TGTCCACGGC	AGTCCCTCTA	360
GAGTGCCTCC	GTCACTCAAC	TGAACAGCT	ATCCCTTCCT	CTCTACTCTT	TCCTAACATG	420
TTCAGTTGAG	TGACGGACTG	GCAACTAGAA	GCAAGGGTGT	CGCTCGTTGC	GGGACTTAAC	480
CCAACATCTC	ACGACACGAG	CTGACGACAA	CCATGCACCA	CCTGTGCAGG	CTCCCGGCAC	540
TCAAGTAGGC	ACTTCATTCT	CCCTCTTACT	ACCTTCTCTA	TCATGCCAC	TTGAGTGCCG	600
GGTCGCTCAC	CTTTCGGCTC	GCTACTACCT	GCATGTCAAG	CCCTGGTAAG	GTTCTTCGCG	660
TTGCTTCGAA	TTAAACCACA	TGCTCCACCG	CTTGTGCGGG	CCCCCGTCAA	TTCTTTGAG	720
TTTCAACCTT	GCGGCGGTAC	TCCCCAGGCG	GGTACTTAT	TGCGTTAACT	ACGGCACGGA	780
ATGCTTCCGC	ATCCCACACC	TAGTACCCAT	CGTTTACGGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	840
ATCCTGTTTTG	CTCCCCACGC	TTTCGCGCCT	CAGCGTCAGG	GTCAGTCCAG	AGAGTCGCCT	900
TCGCCACTGG	TATTCCTCCC	GATATCTACG	CATTTACCCG	CTACACCGGG	AATTCCACTC	960
CCCTCTCCTG	CCCTCTAGCC	ACCCAGTTTC	ATGTGCATCC	CCCGGGTTGA	GCCCGGGTTT	1020
TTTACACCTG	ACTTAAGTGG	CCGCCACGC	GCCCTTTACG	CCCAGTAATT	CCGGACAACG	1080
CTCGCCCCCT	ACGICTTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGGGGCT	TTCGTGTGGT	1140
ACCGTCATCT	ATTCTTCCCA	CACTATCGAG	CTTTACGACC	CGAAGGCCTT	CTTCGCTCAC	1200
GCGGCGTCCG	TGCGTCAGGC	TTTCGCCCAT	TGCGCAAGAT	TCCCCACTGC	TGCCTCCCGT	1260
AGGAGTCTGG	GCCGTGTCTC	AGTCCCAGTG	TGGCCGACCA	CCCTCTCAGG	CCGGCTACCC	1320
GTCGTCCGCT	TGGTAGGCCG	TTACCTTACC	AACTAGCTGA	TGGGACGCGG	GCCCATCCTT	1380
AAGCGGTAGC	TTCCGCTACC	TTCCCTCCTC	ATAGGATGCC	CTACAAGGAG	CTTATCCAGT	1440
ATTAGCACCC	CTTTCGAGGT	GTTATCCCGG	TCTTAAAGGT	AGGTGCCCCA	CGCGTTACTC	1500
ACCCGTCCGC	CGCTATCCGG	CACTCAACTC	CGTGCTTACC	TTACTTTGCA	CCACTTTTAT	1560
TACTTTCTTC	TTCTACTATA	CTTCTTCCC	CTTAAGTAAG	CACTTAGTTG	AGTGCCGGAC	1620
CGCTCGACTT	GCATGTGTTA	GGCACGCCGC	CAGCGTTTCG			1660

FIGURA 4

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp. (SEQ ID NO:3)

CCCGGTGGG	TCACCGGCTT	CGGGTGTCCG	AGGCTCTCGT	GGTGTGACGG	GCGGTGTGTA	60
CAAGGCCCGG	GAACGTATTG	ACCGCGGCAT	GCTGATCCGC	GATTACTAGC	GATTCCGACT	120
TCATGCAGGC	GAGTTGCAGC	CTGCAATCCG	AACTTGGACC	GGCTTTTGG	GATTGCTCC	180
GCCTCGCGG	TTCGCTCCCC	TCTGTACCGG	CCATTGTAGC	ACGTGTGTGG	CCCAGGGCAT	240
ATAGGGCATG	ATGATTTGAC	GTCATCCCCA	CCTTCTCCG	TGTCTCCAC	GGCAGTCCCC	300
CTAGAGTGCC	CGGCTTACCC	GCTGGCAACT	AGAGGCAGGG	GTTGCGCTCG	TGCGGGACT	360
TAACCAACA	TCTCACGACA	CGAGCTGACG	ACAACCATGC	ACCACCTGTG	CAGGCTCCTT	420
ACCTCCCGGT	AAGGTCGCTC	CCCTTTCGGT	TCGCTACTAC	CTGCATGTCA	AGCCCTGGTA	480
AGGTTCTTCG	CGTTGCTTCG	AATTAACCA	CATGCTCCAC	CGTTGTGCG	GGCCCCGTC	540
AATTCCTTTG	AGTTTCAACC	TTGCGGCCGT	ACTCCCCAGG	CGGGTACTT	ATTGCGTTCG	600
CTACGGCAG	GAACGCTTCC	GCGCCCCACA	CCTAGTACCC	ATCGTTTACA	GCGTGGACTA	660
CCAGGGTATC	TAATCCTGTT	CGCTCCCCAC	GCTTTCGGC	CTCAGCGTCA	GGGCCAGTCC	720
AGAGAGTCGC	CTTCGCCACT	GGTATTCCTC	CCGATATCTA	CGCATTTCAC	CGCTACACCG	780
GGAATTCAC	TCCCTCTCC	TGCCCTCTAG	CCAATCAGTT	TCAGATGCTA	CCCCCGGGTT	840
GAGCCCGGGT	CTTTTACACC	TGACTTGATT	GACCGCCTAC	GCGCCCTTTA	CGCCAGTAA	900
TTCCGGACAA	CGCTCGCCCC	CTACGTCTTA	CCGCGGCTGC	TGGCACGTAG	TTAGCCGGGG	960
CTTTCGTGTG	GTACCGTCAT	CCCTTCTTCC	CACACTAACG	GGGTTTACAA	CCCGAAGGCC	1020
TTCTCCCCC	ACGCGGCGTC	GCTGGGTCAG	GCTTCCGCC	ATTGCCAAG	ATTCCCCACT	1080
GCTGCCTCCC	GTAGGAGTCT	GGGCGGTGTC	TCAGTCCCAG	TGTGGCCGAC	CACCCTCTCA	1140
GGCCGGCTAC	CCGTCGTCCG	CTTGGTAGGC	CGTTACCCTA	CCAAC TAGCT	GATGGGACGC	1200
GGGCCATCC	TTAAGCGGTA	GCTTGCGCCT	CCCTTTCCTC	CCTATAGGAT	GCCCTATAAG	1260
GAGCTTATCC	AGTATTACCA	CCCCTTTCGA	GGTGCTATCC	CGGTCTTAAG	GGTAGGTTGC	1320
CCACGGGTTA	CTCACCCGTC	CGCCGCTATC	CGCCACCCAA	CTACGTTGAG	TGCCGGACCG	1380
CTCGACTTGC	ATGTGTTAGG	CACGCCGCCA	GCGTTCGTCC	TGAGCCATGA	TCAAAC	1436

FIGURA 5

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB101G de *Thermoanaerobacter* sp. (SEQ ID NO:4)

gctcaggacg	aacgctggcg	gogtgccctaa	cacatgcaag	togagcggtc	cggcactcaa	60
ctaagtgctt	acttaagggg	aaggaagtat	agtagaagaa	gaaggtaata	aaagtgatgc	120
aaagtaaggt	aagcacggag	ttgagtgccg	gatagcggcg	gacgggtgag	taacgcgtgg	180
gcaacctacc	cttaagaccg	ggataaacacc	togaaagggg	tgctaatact	ggataagctc	240
cttgtagggc	atcctatgag	gagggaaaggt	agcggaaagct	accgcttaag	gatgggcccg	300
cgtcccatca	gctagtgtgt	agggtaacgg	cctaccaagg	cgacgacggg	tagccggcct	360
gagaggggtg	tgggccacac	tgggactgag	acacggccca	gactcctacg	ggaggcagca	420
gtggggaatc	ttgcgcaatg	ggcgaagcc	tgacgcagcg	acgocgcgtg	agcgaagaag	480
gccttcgggt	cgtaaagctc	gatagtgtgg	gaagaataga	tgacgggtacc	acacgaaagc	540
cccggctaac	tacgtgccag	cagccgcggt	aagacgtagg	gggcgagcgt	tgtccggaat	600
tactgggcgt	aaagggcgcg	taggcggcca	cttaagtcag	gtgtaaaaaa	cccgggctca	660
acccggggga	tgcacatgaa	actgggtggc	tagagggcag	gagagggggag	tggaattccc	720
gggtgtagcgg	tgaaatgctg	agatatcggg	aggaatacca	gtggcgaagg	cgactctctg	780
gactgacctt	gacgctgagg	cgcgaaagcg	tggggagcaa	acaggattag	ataccctggt	840
agtccacgcc	gtaaacgatg	gttactaggt	gtgggatgcg	gaagcattcc	gtgccgtagt	900
taacgcaata	agtaccccgc	ctggggagta	cggccgcaag	gttgaaactc	aaaggaattg	960
acggggggccc	gcacaagcgg	tggagcatgt	ggtttaattc	gaagcaacgc	gaagaacctt	1020
accagggcctt	gacatgcagg	tagtagcgag	ccgaaaggtg	agcgacccgg	cactcaagtg	1080

FIGURA 6

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB101X de *Thermoanaerobacter* sp. (SEQ ID NO:5)

GCCCCACTTT	CGACGGCTCC	CTCCTTCCCG	GTTGGGTAC	CGGCTTCGGG	TGTCGCAGGC	60	
TCTCGTGGTG	TGACGGGCGG	TGTGTACAAG	GCCCCGGAAC	GTATTCACCG	CGGCATGCTG	120	
ATCCGCGATT	ACTAGCGATT	CCGACTTCAT	GCAGGCGAGT	TGCAGCCTGC	AATCCGAAC	180	
TGGACCGGCT	TTTTGGGATT	CGCTCCGCCT	CGCGGCTTCG	CTCCCTCTG	TACCGGCCAT	240	
TGTAGCACGT	GTGTGGCCCA	GGGCATATAG	GGCATGATGA	TTTGACGTCA	TCCCCACCTT	300	
CCTCCGTGTC	CTCCACGGCA	GTCCCTCTAG	AGTGCCCCGGC	TTACCCGCTG	GCAACTAGAG	360	
GCAGGGGTTG	CGCTCGTTGC	GGGACTTAAC	CCAACATCTC	ACGACACGAG	CTGACGACAA	420	
CCATGCACCA	CCTGTGCAGG	CTCCTTACCT	CCCGGTAAGG	TCGCTCCCC	TTCGGTTTCG	480	
TACTACCTGC	ATGTCAAGCC	CTGGTAAGGT	TCTTCGCGTT	GCTTCGAATT	AAACCACATG	540	
CTCCACCGCT	TGTGGGGGCC	CCCGTCAATT	CCTTTGAGTT	TCAACCTTGC	GGCCGTA	600	
CCCAGGCGGG	GTA	CGTTTCGCTAC	GGCACGGAAC	GCTTCGCGC	CCCACACCTA	660	
GTACCCATCG	TTTACAGCGT	GGACTACCAG	GGTATCTAAT	CCTGTTCGCT	CCCCACGCTT	720	
TCGCGCCTCA	GCGTCAGGGC	CAGTCCAGAG	AGTCGCCTTC	GCCACTGGTA	TTCCCTCCCGA	780	
TATCTACGCA	TTTCACCGCT	ACACCGGAA	TTCCACTCCC	CTCTCCTGCC	CTCTAGCCAA	840	
TCAGTTTCAG	ATGCTACCCC	CGGGTTGAGC	CGGGGTCTTT	TACACCTGAC	TTGATTGACC	900	
GCCTACGCGC	CCTTTACGCC	CAGTAATTC	GGACAACGCT	CGCCCCCTAC	GTCTTACCGC	960	
GGCTGCTGGC	ACGTAGTTAG	CCGGGGCTTT	CGTGTGGTAC	CGTCATCCCT	TCTTCCCACA	1020	
CTAACGGGGT	TTACAACCCG	AAGGCCTTC	TCCCCCAGC	GGCGTCGCTG	GGTCAGGCTT	1080	
CCGCCCATTG	CCCAAGATTC	CCC	ACTGCTG	CCTCCCGTAG	GAGTCTGGGC	CGTGTCTCAG	1140
TCCAGTGTG	GCCGACCACC	CTCTCAGGCC	GGCTACCCGT	CGTCGCCTTG	GTAGGCCGTT	1200	
ACCCTACCAA	CTAGCTGATG	GGACGCGGGC	CCATCCTTAA	GCGGTAGCTT	GCGCCTCCCT	1260	
TTCCCTCCCTA	TAGGATGCCC	TATAAGGAGC	TTATCCAGTA	TTACCACCCC	TTTCGAGGTG	1320	
CTATCCCGGT	C	TTAAGGGTA	GGTTGCCAC	GCGTACTCA	CCCGTCCGCC	GCTATCCGCC	1380
ACCCA	ACTAC	GTTGAGTGCC	GGACCGCTCG	ACTTGCATGT	GTTAGGCACG	CCGCCAGCGT	1440
TCGTCCTGAG	C					1451	

FIGURA 7

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB103X de *Thermoanaerobacter* sp. (SEQ ID NO:6)

TTCACCCCAA	TCACCTGCCC	CACCTTCGAC	GGCTCCCCTCC	TCCCCGGTTG	GGTCACCGGC	60
TTCCGGGTGTC	GCAGGCTCTC	GTGGTGTGAC	GGGCGGTGTG	TACAAGGCC	GGGAACGTAT	120
TCACCGCGGC	ATGCTGATCC	GCGATTACTA	GCGATTCCGA	CTTCATGCAG	GCGAGTTGCA	180
GCCTGCAATC	CGAACTTGA	CCGGCTTTTT	GGGATTCCGCT	CCGCCTCGCG	GCTTCGCTCC	240
CCTCTGTACC	GGCCATTGTA	GCACGTGTGT	GGCCCAGGEC	ATATAGGGCA	TGATGATTTG	300
ACGTCAATCC	CACCTTCCTC	CGTGTCTCTC	ACGGCAGTCC	CCCTAGAGTG	CCCGGCTTAC	360
CCGCTGGCAA	CTAGAGGCAG	GGGTTGCGCT	CGTTGCGGGA	CTTAACCCAA	CATCTCACGA	420
CACGAGCTGA	CGACAACCAT	GCACCACCTG	TGCAGGCTCC	TTACCTCCCG	GTAAGGTCGC	480
TCCCCTTTTCG	GTTCGCTACT	ACCTGCATGT	CAAGCCCTGG	TAAGGTTCTT	CGCGTTGCTT	540
CGAATTA AAC	CACATGCTCC	ACCGCTTGTG	CGGGCCCCCG	TCAATTCCTT	TGAGTTTCAA	600
CCTTGGCGGCC	GTA CTCCCCA	GGCGGGGTAC	TTATTGCGTT	CGCTACGGCA	CGGAACGCTT	660
CCGCGCCCCA	CACCTAGTAC	CCATCGTTTA	CAGCGTGGAC	TACCAGGGTA	TCTAATCCTG	720
TTGCTCCCC	ACGCTTTCGC	GCCTCAGCGT	CAGGGCCAGT	CCAGAGAGTC	GCCTTCGCCA	780
CTGGTATTCC	TCCC GATATC	TACGCATTTT	ACCGCTACAC	CGGGAATTCC	ACTCCCCTCT	840
CCTGCCCTCT	AGCCAATCAG	TTTCAGATGC	TACCCCCGGG	TTGAGCCCGG	GTCTTTTACA	900
CCTGACTTGA	TTGACCGCCT	ACGCGCCCTT	TACGCCCAGT	AATTCGGGAC	AACGCTCGCC	960
CCCTACGTCT	TACCGCGGCT	GCTGGCACGT	AGTTAGCCGG	GGCTTTCGTG	TGGTACCGTC	1020
ATCCCTTCTT	CCCACACTAA	CGGGGTTTAC	AACCCGAAGG	CCTTCCTCCC	CCACGCGGGC	1080
TCGCTGGGTC	AGGCTTCCGC	CCATTGCCCA	AGATTCCCCA	CTGCTGCCTC	CCGTAGGAGT	1140
CTGGGCCGTG	TCTCAGTCCC	AGTGTGGCCG	ACCACCCTCT	CAGGCCGGCT	ACCCGTCGTC	1200
GCCTTGGTAG	GCCGTTACCC	TACCAACTAG	CTGATGGGAC	GCGGGCCCAT	CCTTAAGCGG	1260
TAGCTTGGCC	CTCCCTTTCC	TCCCTATAGG	ATGCCCTATA	AGGAGCTTAT	CCAGTATTAC	1320
CACCCCTTTC	GAGGTGCTAT	CCCGGTCTTA	AGGGTAGGTT	GCCCACGCGT	TACTCACCCG	1480
TCCGCCGCTA	TCCGCCACCC	AACTACGTTG	AGTGCCGGAC	CGCTCGACTT	GCATGTGTTA	1540
GGCACGCGCC	CAGCGTTCGT	CCTGA				1565

FIGURA 8

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB104X de *Thermoanaerobacter* sp. (SEQ ID NO:7)

ACTCAAGTGG	GCACGTTTTT	TTCTCTTCAT	CACGTTTCTA	ACATGCCCAC	TTGAGTGCCG	60
GGTTGGGTCA	CCGGCTTCGG	GTGTTGCAGA	CTCTCGTGGT	GTGACGGGCG	GTGTGTACAA	120
GGCCCCGGAA	CGTATTCACC	GCGGCATGCT	GATCCGCGAT	TACTAGCGAT	TCCGACTTCA	180
TGCAGGCGAG	TTGCAGCCTG	CAATCCGAAC	TTGGACCGGC	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	TGACGACTG	GCAACTAGAA	GCAAGGGTTG	CGCTCGTTGC	GGGACTTAAC	480
CCAACATCTC	ACGACACGAG	CTGACGACAA	CCATGCACCA	CCTGTGCAGG	CTCCCGGCAC	540
TCAAGTAGGC	ACTTCATTCT	CCCTCTTACT	ACCTTCTCTA	TCATGCCCAC	TTGAGTGCCG	600
GGTCGCTCAC	CTTTTCGGCTC	GCTACTACCT	GCATGTCAAG	CCCTGGTAAG	GTTCCTTCGCG	660
TTGCTTCGAA	TAAACCACA	TGCTCCACCG	CTTGTGCGGG	CCCCCGTCAA	TTCCTTTGAG	720
TTTCAACCTT	GCGGCCGTAC	TCCCCAGGCG	GGTACTTAT	TGCGTTAACT	ACGGCACGGA	780
ATGCTTCCGC	ATCCCACACC	TAGTACCCAT	CGTTTACGGC	GTGGACTACC	AGGGTATCTA	840
ATCCTGTTTG	CTCCCACGCG	TTTCGCGCCT	CAGCGTCAGG	GTCAGTCCAG	AGAGTCGCCCT	900
TCGCCACTGG	TATTCCTCCC	GATATCTACG	CATTTACCCG	CTACACCGGG	AATTCCACTC	960
CCCTCTCCTG	CCCTCTAGCC	ACCCAGTTTC	ATGTGCATCC	CCCGGGTTGA	GCCCAGGTTT	1020
TTTACACCTG	ACTTAAGTGG	CCGCCTACGC	GCCCTTTACG	CCCAGTAATT	CCGGACAACG	1080
CTCGCCCCCT	ACGTCTTACC	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGGGGCT	TTCGTGTGGT	1140
ACCGTCACTT	ATTCCTCCCA	CACTATCGAG	CTTTACGACC	CGAAGGCCTT	CTTCGCTCAC	1200
GCGGCGTCGC	TGCGTCAGGC	TTTCGCCCAT	TGGCAAGAT	TCCCCACTGC	TGCCCTCCCGT	1260
AGGAGTCTGG	GCCGIGTCTC	AGTCCCAGTG	TGGCCGACCA	CCCTCTCAGG	CCGGCTACCC	1320
GTCGTGCGCT	TGGTAGGCCG	TIACCCTACC	AACTAGCTGA	TGGGACGCGG	GCCCATCCTT	1380
AAGCGGTAGC	TTCCGCTACC	TTCCCTCCTC	ATAGGATGCC	CTACAAGGAG	CTTATCCAGT	1440
ATTAGCACCC	CTTTGAGAGT	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 9

Secuencia consenso de ADNr 16S para DIB107X de *Thermoanaerobacter* sp. (SEQ ID NO: 8)

TCAGGACGAA	CGCTGGCGGC	GTGCCTAACA	CATGCAAGTC	GAGCGGTCCG	GCACTCAACG	60
TAGTTGAGTG	GCGGATAGCG	GCGGACGGGT	GAGTAACGCG	TGGGCAACCT	ACCCTTAAGA	120
CCGGGATAGC	ACCTCGAAAG	GGGTGGTAAT	ACTGGATAAG	CTCCTTATAG	GGCATICCTAT	180
AGGGAGGAAA	GGGAAGCGCA	AGCTACCGCT	TAAGGATGGG	CCCGGTCCC	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	AAGCCCCGGC	TAACTACGTG	480
CCAGCAGCCG	CGGTAAGACG	TAGGGGCGA	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
GAGGCCCGAA	AGCGTGGGGA	GCGAACAGGA	TTAGATACCC	TGGTAGTCCA	CGCTGTAAAC	780
GATGGGTACT	AGGTGTGGGG	CGCGGAAGCG	TTCCGTGCCG	TAGCGAACGC	AATAAGTACC	840
CCGCCTGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	GCCCGCACAA	900
GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA	ATTCGAAGCA	ACGCGAAGAA	CCTTACCAGG	GCTTGACATG	960
CAGGTGGTAG	CGAACCGAAA	GGTGAGCGAC	CTTACCGGGA	GGTAAGGAGC	CTGCACAGGT	1020
GGTGCATGGT	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC	1080
AACCCCTGCC	TCTAGTTGCC	AGCGG				1105

FIGURA 10

Cepa	Sustrato	Etanol	Acetato	Lactato	Etanol:Acetato:Lactato
		mM	mM	mM	mM:mM:mM
DIB004G	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	21,60	2,41	17,09	1 : 0,1 : 0,8
	Glucosa (25 mM)	23,24	0,66	17,92	1 : 0,03 : 0,8
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	sin crecimiento			
	Xilosa (30 mM)	17,05	0,00	10,27	1 : 0,00 : 0,6
DIB087G	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	6,75	9,55	25,75	1 : 1,4 : 3,8
	Glucosa (25 mM)	1,16	4,20	23,82	1 : 3,6 : 20,6
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	sin crecimiento			
	Xilosa (30 mM)	2,91	5,84	17,52	1 : 2,0 : 6,0
DIB097X	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	29,81	5,30	8,85	1 : 0,2 : 0,3
	Glucosa (25 mM)	31,71	2,77	11,91	1 : 0,1 : 0,4
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	19,83	8,95	5,10	1 : 0,5 : 0,3
	Xilosa (30 mM)	25,46	1,07	8,16	1 : 0,04 : 0,3
DIB101G	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	15,36	1,80	9,28	1 : 0,1 : 0,6
	Glucosa (25 mM)	16,30	0,50	12,23	1 : 0,03 : 0,8
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	sin crecimiento			
	Xilosa (30 mM)	15,42	0,80	9,10	1 : 0,05 : 0,6
DIB101X	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	12,31	2,70	6,70	1 : 0,2 : 0,5
	Glucosa (25 mM)	9,20	3,75	9,27	1 : 0,4 : 1,0
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	23,34	6,57	3,15	1 : 0,3 : 0,1
	Xilosa (30 mM)	19,80	3,89	6,93	1 : 0,2 : 0,4
DIB103X	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	36,67	6,60	9,90	1 : 0,2 : 0,3
	Glucosa (25 mM)	29,24	0,65	7,77	1 : 0,02 : 0,3
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	29,36	6,73	2,83	1 : 0,3 : 0,1
	Xilosa (30 mM)	25,52	3,82	6,29	1 : 0,2 : 0,3
DIB104X	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	18,54	4,89	19,11	1 : 0,3 : 1,0
	Glucosa (25 mM)	6,71	3,25	23,21	1 : 0,5 : 3,5
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	sin datos			
	Xilosa (30 mM)	13,53	5,73	14,17	1 : 0,4 : 1,1
DIB107X	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	35,87	4,74	12,12	1 : 0,1 : 0,3
	Glucosa (25 mM)	21,96	1,93	15,10	1 : 0,1 : 0,7
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	24,49	6,14	2,30	1 : 0,3 : 0,1
	Xilosa (30 mM)	28,74	4,74	8,49	1 : 0,2 : 0,3
<i>T. mathranii</i> DSM11426	Celobiosa (equiv. gluc. 25 mM)	12,39	7,21	18,68	1 : 0,6 : 1,5
	Glucosa (25 mM)	17,17	8,54	16,95	1 : 0,5 : 1,0
	Xilano (equiv. de xilosa 31 mM)	19,94	4,86	2,72	1 : 0,2 : 0,1
	Xilosa (30 mM)	13,66	4,86	12,60	1 : 0,4 : 0,9

Todos los cultivos se desarrollaron en recipientes sellados a 72 °C durante 6 días sin agitación

FIGURA 11

Cultivo	Sustrato	Productos de fermentación					
		Etanol	Acetato	Lactato	Etanol:Acetato:Lactato	Productos totales	Rendimiento de etanol
	g/l (peso seco)	mM	mM	mM	mM:mM:mM	mM	% mol
DIB097X	álamo (20 g/l)	13,1	7,4	4,3	1 : 0,56 : 0,33	24,8	52,82
DIB087G		0,73	4,73	4,62	1 : 6,52 : 6,36	10,08	7,24
DIB097X		13,1	7,4	4,3	1 : 0,56 : 0,33	24,8	52,82
DIB101X		14,4	6,3	4,3	1 : 0,44 : 0,30	25,0	57,60
DIB103X		8,51	8,15	6,07	1 : 0,96 : 0,71	22,7	37,44
DIB104X		3,79	11,08	7,04	1 : 2,92 : 1,86	21,9	17,30
DIB107X		8,57	7,39	3,35	1 : 0,86 : 0,39	19,3	44,38
DSM11426		7,8	5,7	3,3	1 : 0,73 : 0,42	16,8	46,43
DIB004G	álamo	4,33	4,42	2,95	1 : 1,0 : 0,7	11,70	37,01
DIB097X	(10 g/l)	5,12	4,28	0,00	1 : 0,8 : 0,0	9,40	54,47
DIB004G	<i>Miscanthus</i>	4,96	6,94	3,36	1 : 1,4 : 0,7	15,26	32,50
DIB097X	(10 g/l)	7,17	7,72	0,00	1 : 1,1 : 0,0	14,89	48,15
DIB004G	bagazo de caña de azúcar	5,49	10,38	7,35	1 : 1,9 : 1,3	23,22	23,64
DIB097X	(10 g/l)	12,76	8,24	3,19	1 : 0,7 : 0,3	24,19	52,75
DIB004G	paja de trigo	5,18	4,36	3,16	1 : 0,8 : 0,6	12,70	40,79
DIB097X	(10 g/l)	8,02	5,55	0,00	1 : 0,7 : 0,0	13,57	59,10
DIB004G	tallos de maíz	5,04	6,95	3,42	1 : 1,4 : 0,7	15,41	32,71
DIB097X	(10 g/l)	9,23	7,28	0,00	1 : 0,8 : 0,0	16,51	55,91
DIB004G	DDGS	9,61	4,27	2,51	1 : 0,4 : 0,3	16,39	58,63
DIB097X	(10 g/l)	10,95	4,57	1,85	1 : 0,4 : 0,2	17,37	63,04
DIB004G	Residuos de papel sin tratar	2,63	2,53	2,86	1 : 1,0 : 1,1	8,02	32,79
DIB097X	(10 g/l)	2,24	2,85	0,00	1 : 1,3 : 0,0	5,09	44,01

Todos los cultivos se desarrollaron en recipientes sellados a 72 °C durante 6 días con agitación a 100 rpm

FIGURA 12

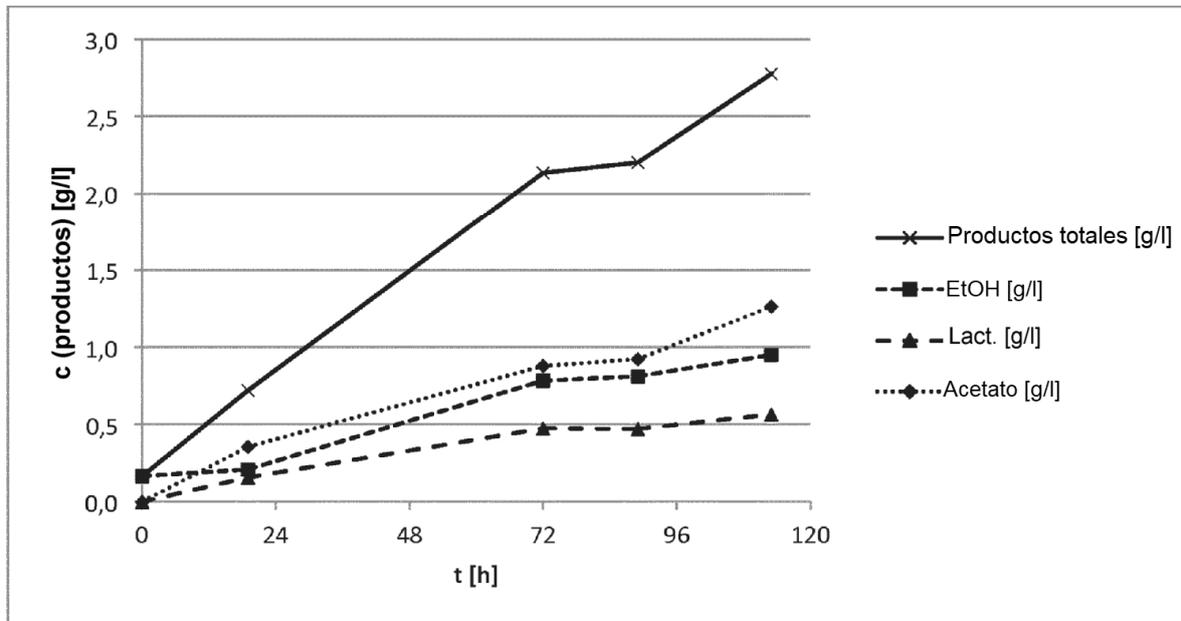
Fermentación de DIB097X de *Thermoanaerobacter* sp. sobre pasto *Miscanthus* pretratado

FIGURA 13

Fermentación de DIB004G de *Thermoanaerobacter* sp. sobre semilla de maíz triturada sin tratamiento previo

