



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102013902120834
Data Deposito	24/01/2013
Data Pubblicazione	24/07/2014

Classifiche IPC

Titolo

PROCEDIMENTO PER IL SEQUESTRO DI ANIDRIDE CARBONICA E LA PRODUZIONE FERMENTATIVA DI COMPOSTI ORGANICI
--

Deposito della domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“PROCEDIMENTO PER IL SEQUESTRO DI ANIDRIDE CARBONICA E LA PRODUZIONE FERMENTATIVA DI COMPOSTI ORGANICI”

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda l'uso di componenti biologiche di microrganismi anaerobi, in particolare colture o enzimi di batteri anaerobici, come agenti per la cattura ed il sequestro di anidride carbonica per reazione con un opportuno substrato organico. I prodotti derivanti da tale reazione sono molecole organiche impiegabili come materia prima in industrie, quali alimentare, biomedica, cosmetica e zootecnica.

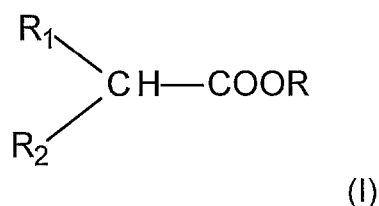
STATO DELLA TECNICA

L'attuale consenso della comunità scientifica è che la concentrazione atmosferica di CO₂ continuerà ad aumentare in modo direttamente proporzionale al consumo di combustibili fossili, con notevoli conseguenze per il clima globale. Chiaramente, lo scenario ottimale per il futuro comporta una transizione a energia rinnovabile, ma, in alternativa o in strategie frattempo, sequestro o attenuazione sono considerate come i principali obiettivi per diminuire il rischio di cambiamenti climatici gas serra indotto.

Lo scopo della presente invenzione è quindi fornire un processo di abbattimento dell'anidride carbonica.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Lo scopo indicato più sopra è stato raggiunto mediante un procedimento in grado di catturare l'anidride carbonica e convertirla in composti organici impiegabili come materia prima industriale. L'invenzione ha quindi come oggetto un procedimento per la produzione di almeno un composto organico di formula (I):



in cui

R è H o metallo alcalino,

R_1 è -H, -OH, -O-alchile, -O-CO-alchile, -NH₂, =O, -NH-CO-alchile, -NH-alchile, -SH, -S-alchile, dove alchile è C1-C3 lineare o ramificato,

R_2 è -H, -OH, -NH₂, alchile C1-C6 lineare o ramificato, oppure alchile C1-C6 lineare o ramificato sostituito con almeno un gruppo -OH o -NH₂,

a condizione che R_1 ed R_2 non siano contemporaneamente -H, e

R_2 non è presente, se R_1 è =O,

comprendente le fasi di:

- i) fornire un enzima avente almeno una regione proteica piruvato:ferredossina ossido reduttasi (PFOR), suo derivato od omologo di sequenza avente una omologia di almeno il 75%;
- ii) aggiungere un substrato organico;
- iii) aggiungere CO₂;
- iv) lasciare reagire la miscela risultante in condizioni anaerobiche per almeno 6 ore; e
- v) separare l'almeno un composto organico di formula (I) così ottenuto.

Sotto un altro aspetto, la presente invenzione concerne un impianto per l'implementazione del procedimento sopra citato, comprendente:

- almeno un reattore, dotato di ingresso per l'alimentazione della CO₂, ingresso per l'alimentazione del substrato organico, uscita per la raccolta dei prodotti di reazione, ed uscita per la raccolta di gas;
- almeno un dispositivo di separazione dei prodotti di reazione; ed
- almeno un contenitore per la raccolta dell'almeno un composto organico di formula (I) separato.

Nella presente invenzione, quando si impiega:

- "substrato organico" si intende uno o più composti, preferibilmente acido formico o suoi sali oppure composti di formula R_2CH_2COOR , in cui R ed R_2 sono come sopra definiti, essendo in particolare, acido acetico o suoi sali, acido propionico e suoi sali, acido butirrico o suoi sali, detti uno o più composti essendo forniti in forma pura oppure come prodotto metabolico *in situ* di matrici organiche semplici, quali monosaccaridi, disaccaridi, polisaccaridi, proteine, oppure di matrici organiche complesse, quali sottoprodotti o materiali di scarto dell'industria alimentare, dell'agricoltura, o

biomasse algali; e

- “CO₂” o “anidride carbonica”, si intende che tale componente può essere in forma gassosa, pura o in miscela con altri gas, oppure in forma di sale inorganico, in forma solida o in soluzione, oppure in matrice organica in grado di liberarla.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

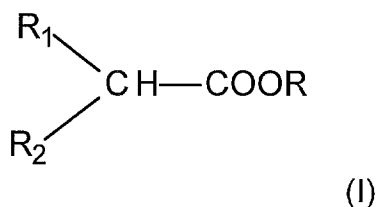
Le caratteristiche ed i vantaggi della presente invenzione saranno evidenti dalla descrizione dettagliata di seguito riportata, dall'esempio realizzativo fornito a titolo illustrativo e non limitativo, e dalle Figure allegate, in cui:

- Figura 1 mostra il *sequence listing* della proteina tetramerica PFOR;
- Figura 2 mostra il pathway metabolico che, nel batterio *T. neapolitana*, il glucosio segue in presenza di CO₂;
- Figura 3 mostra (a) il pathway metabolico che, nel batterio *T. neapolitana*, il glucosio segue in presenza di CO₂ e (b) le corrispondenti reazioni di fissazione della [¹³C]-CO₂ che avvengono lungo tale pathway; linea in grassetto = legame tra due carboni accoppiati;
- Figura 4 mostra il gel SDS-PAGE (10%) dell'analisi Western Blot dell'espressione dell'enzima PFOR in colture di *T. neapolitana* cresciute in condizioni standard ed alimentate ad intervalli regolari con N₂ (*TnN*) oppure CO₂ (*TnC*);
- Figura 5a mostra il tasso di consumo di glucosio in colture di *T. neapolitana* in presenza di glucosio 25mM ed alimentate con N₂ oppure CO₂;
- Figura 5b mostra la resa di idrogeno (H₂) dopo 24 ore e dopo 48 ore delle colture di *T. neapolitana* in presenza di glucosio 25mM ed alimentate con N₂ (*TnN*) oppure CO₂ (*TnC*);
- Figura 5c mostra la resa di acido acetico ed acido lattico dopo 24 ore e dopo 48 ore delle colture di *T. neapolitana* in presenza di glucosio 25mM ed alimentate con N₂ (*TnN*) oppure CO₂ (*TnC*);
- Figura 5d mostra la resa dei prodotti: acido acetico, acido lattico ed idrogeno, espressa in termini di rapporto mol prodotto/mol glucosio delle colture di *T. neapolitana* in presenza di glucosio 25mM ed alimentate con N₂ (*TnN*), CO₂ (*TnC*) oppure N₂ (*TnN*) + NaHCO₃ 14mM;

- Figura 6 mostra una vista schematica di una forma di realizzazione dell'impianto dell'invenzione; 1 = alimentazione del substrato per la reazione con anidride carbonica; 2 = alimentazione anidride carbonica gassosa o in soluzione; 3 = uscita idrogeno; 4 = reattore; 5 = uscita prodotti;
- Figura 7 mostra gli spettri ^{13}C -NMR del mezzo di coltura di *T. neapolitana* dopo alimentazione con $^{13}\text{CO}_2$ o $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. (a) alimentazione di $^{13}\text{CO}_2$ (*TnC*); (b) alimentazione di 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ e N_2 ; (c) controllo. * = carbonio marcato; linea in grassetto = legame tra due carboni accoppiati; e
- Figura 8 mostra gli spettri ^{13}C -NMR del mezzo di coltura di *T. neapolitana* dopo co-alimentazione con 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ e diversi substrati organici. Le crescite erano effettuate sotto condizioni standard con insufflazione di N_2 . Gli ingrandimenti di spettri indicano i carboni ^{13}C accoppiati. (a) 28 mM $2\text{-}^{13}\text{C}$ glucosio e 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$; (b) 14 mM $2\text{-}^{13}\text{C}$ piruvato di sodio e 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$; (c) 14 mM $1\text{-}^{13}\text{C}$ acetato di sodio e 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$; (d) controllo (28 mM glucosio e 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione ha quindi come oggetto un procedimento per la produzione di almeno un composto organico di formula (I):



in cui

R è H o metallo alcalino,

R_1 è -H, -OH, -O-alchile, -O-CO-alchile, - NH_2 , =O, -NH-CO-alchile, -NH-alchile, -SH, -S-alchile, dove alchile è C1-C3 lineare o ramificato,

R_2 è -H, -OH, - NH_2 , alchile C1-C6 lineare o ramificato, oppure alchile C1-C6 lineare o ramificato sostituito con almeno un gruppo -OH o - NH_2 ,

a condizione che R_1 ed R_2 non siano contemporaneamente -H, e

R_2 non è presente, se R_1 è =O,

comprendente le fasi di:

- fornire un enzima avente almeno una regione proteica piruvato:ferredossina

ossido reduttasi (PFOR), suo derivato od omologo di sequenza avente una omologia di almeno il 75%;

ii) aggiungere un substrato organico;

iii) aggiungere CO₂;

iv) lasciare reagire la miscela risultante in condizioni anaerobiche per almeno 6 ore; e

v) separare l'almeno un composto organico di formula (I) così ottenuto.

Si è infatti sorprendentemente trovato che detta PFOR è in grado di catturare e fissare l'anidride carbonica, vantaggiosamente promuovendo la sintesi dell'almeno composto organico di formula (I), che può poi essere ulteriormente utilizzato come materia prima industriale, ad esempio nell'industria alimentare, biomedica, cosmetica o zootecnica.

Come si vedrà nel seguito, l'alimentazione di CO₂ influisce direttamente sui parametri principali di produzione di detto almeno un composto organico di formula (I) quando la miscela di reazione è lasciata reagire tal quale.

Vantaggiosamente, l'anidride carbonica può essere gas di scarico di impianti industriali oppure di centrali termoelettriche, contribuendo in tal modo alla riduzione dell'inquinamento atmosferico.

L'anidride carbonica può essere aggiunta, ad esempio in forma di gas di scarico, al tempo stesso, al fine di scaldare l'ambiente di reazione, preferibilmente a temperature tra 60 e 80°C.

Preferibilmente, detta regione proteica piruvato:ferredossina ossido reduttasi (PFOR), è codificata da batteri dell'Ordine tassonomico *Thermotogales*, più preferibilmente da batteri del genere *Thermotoga*, quali *T. neapolitana*, *T. naphthophila*, *T. petrophila*, *T. maritima*, *T. subterranea*, *T. elfii*, *T. lettingae*, *T. thermarum*, o *Thermosipho*, quali *T. geodei*, *T. melanesiensis*, *T. japonicus*, *T. africanus*. Questi batteri sono in grado di produrre idrogeno per fermentazione anaerobica e non-fotosintetica (*dark fermentation*) dei carboidrati. In particolare, come si vedrà nell'Esempio di seguito, si è osservata una produzione di H₂ molto prossima al valore teorico di 4 molecole di H₂ per molecola di glucosio che entra nel processo glicolitico. La produzione complessiva di idrogeno corrisponde circa a 0.25-0.50 m³ di gas idrogeno per kilogrammo di glucosio. La sintesi fermentativa

di idrogeno è associata al rilascio di due molecole di acido acetico e due di anidride carbonica per molecola di glucosio.

In una forma di realizzazione preferita, detti batteri sono della specie *Thermotoga neapolitana*.

Secondo una forma di realizzazione particolarmente preferita, detta PFOR è una proteina tetramerica avente numeri di accesso NCBI YP_002534223.1 (SEQ ID NO.1), YP_002534222.1 (SEQ ID NO.2), YP_002534225.1 (SEQ ID NO.3), YP_002534224.1 (SEQ ID NO.4) ed è codificata dal cluster genetico *porBACD* del batterio *Thermotoga neapolitana* (Figura 1):

Subunità porA (SEQ ID NO.1): YP_002534223.1

MKMERVVERVAVTGAEAVANAMRQIEPDVVAAYPITPQTPIVEYFARF
VADGIVKTEMIPVESEHSAMSAVVGAAAAGARAMTATSANGLALMHEI
VYIAASYRLPIVMPVVRNRLSGPINIHCDHSDAMAERDSGWIQLFAET
NQEAYDFTILAVRLAEHSDVRLPVMVNLDGFILSHGVEPVEFYPPDDL
KKFVGELKPMYPLLGTGHPVTWGPLDLYDYFHEHKRQQIEAMENVKK
VFPEIAKEFEETFGRKYWFVEPYKLDDAEHVMVALGSTNSTIKYVVD
LREEGHKVGALKIWMFRFPFKEQLQELLNGRKSIVLDRAVSFGAEA
PLYEAVKSSLYEVAARPSLGSYVYGLGGGRDIKPEHIRKAFEDAINGNLI
ADEQRYLGLRE

Subunità porB (SEQ ID NO.2): YP_002534222.1

MPVNIKQLAQEFDDKKEIGITQGHRLCPGCGAPITVKFVMMIARHLGYE
PVVGLATGCLEVSTTIYPYTAWSVPYIHNAFENVAATMSGVETAYRAL
KNKGKIPEDKKYAFIAFGGDDGGTYDIGLQSLSGMLERGHKVLVLYDN
EGYMNTGNQRSGSTPPGSDTTTAPVGKKLPGKVQLKKNIVEIVAHE
NVYAATAALSEPMDFFAKVEKALNFDGPSFLAVLSPCVRFWRVNDK
TVEISKLAVENTKYWPLYEVERGVYRVTRKPRQFKPVEEFLRAQGRFR
KLLSRPDAKEIIDELQEYVDRRWERLLALEEATKDKPIR

Subunità porC (SEQ ID NO.3): YP_002534225.1

MCKEVQSMPVAKKYFEIRWHGRAGQGAKSASQMLAEAALEAGKFVQ
AFPEYGAERTGAPMRAFNRIODEYIRVRSIENPDVVVIDETLLSPA
VEGLSEDGILLVNTVKDFEFVRQKTGFNGKICVVDATDIALQEIKRGIP
NTPMLGALVRVTGVVPLEVIEKRIEKMFGKKFPQEVVEANKRALRRGY
EEVKCSE

Subunità porD (SEQ ID NO.4): YP_002534224.1

MSLKSWEIPIGGVIDKPGTAREYKTGTWRVMPILHKEKCIDCMFC
WLYCPDQAIQEGGIMKGFNYDYCKGCGLCANVCPKQAIEMRPETEF
LGEEG

T. neapolitana è un batterio anaerobico eterotrofico che può essere isolato da sorgenti marine di acqua calda.

La fase iv) del procedimento dell'invenzione prevede che la miscela venga lasciata reagire per almeno 6 ore. In questa fase, si è osservato che il substrato organico, ossia preferibilmente il composto di formula R_2CH_2COOR , in presenza di PFOR, reagisce con la CO_2 a dare l'almeno un composto organico di formula (I), per sintesi diretta oppure, quando nel substrato organico è presente almeno un precursore metabolico di R_2CH_2COOR , passando attraverso la formazione di un composto intermedio di formula R_2CH_2COCOR (Figura 3).

Preferibilmente, nella fase iv) del procedimento, la miscela è lasciata reagire per un tempo da 12 a 72 ore, più preferibilmente da 20 a 50 ore.

Preferibilmente, detto substrato organico comprende un composto di formula R_2CH_2COOR , in cui R ed R_2 sono come sopra definito, oppure almeno un suo precursore metabolico, ossia un monosaccaride, un disaccaride, un polisaccaride, o loro miscele.

Con "monosaccaride", si intende un glicide semplice, ovvero che non può essere decomposto per idrolisi. I monosaccaridi non sostituiti hanno formula generale $(CH_2O)_n$ (con $n=3, 4, 5, \dots$). Il numero di atomi di carbonio va da 3 fino a 9 per i monosaccaridi di più elevato peso molecolare, ma quelli più importanti sono i pentosi (arabinosio, ribosio, xilosio ecc.) e gli esosi (glucosio, fruttosio, galattosio ecc.).

Con "disaccaride", si intende un acetale formato da due monosaccaridi legati mediante un legame acetalico comunemente chiamato legame O-glicosidico. I più importanti disaccaridi sono: cellobiosio, due molecole di D-glucosio con legame 1-4 β glicosidico; maltosio, due molecole di α -D-glucosio con legame 1-4 α glicosidico; lattosio, una molecola di D-glucosio e una di D-galattosio con legame 1-4 β glicosidico; saccarosio, una molecola di glucosio e una di fruttosio con legame 1-2 α glicosidico; trealosio, due molecole di glucosio con legame 1,1 α glicosidico.

Con "polisaccaride", si intende composti formati da almeno 3 monosaccaridi. Tra i più importanti, vi sono ciclodestrina, melitosio, frutto-oligosaccaridi, agarosio, glicogeno, destrano, amido, cellulosa, emicellulosa, pectina, amilopectina, amilosio, chitina, callosio, laminarina, mannano, fucoidano, galactomannano, inulina, destrina, maltodestrina, glicani e xilani.

Preferibilmente, detto substrato organico comprende acido acetico o suoi sali oppure un suo precursore metabolico, quale un monosaccaride; più preferibilmente, detto almeno precursore metabolico è glucosio.

Preferibilmente, detto almeno un composto organico di formula (I) è acido lattico.

Preferibilmente, i batteri *Thermotogales* sono forniti in un mezzo acquoso, quale acqua marina oppure acqua arricchita con sali minerali, vitamine ed analoghi nutrienti.

È da intendersi che risultano analogamente preferite, e quindi descritte, anche tutte le possibili combinazioni degli aspetti preferiti del procedimento, come sopra riportati.

Secondo una forma di realizzazione preferita, il procedimento dell'invenzione comprende le fasi di:

- i) fornire piruvato:ferredossina ossido reduttasi (PFOR) codificata dal cluster genetico *porBACD* del batterio *Thermotoga neapolitana*;
- ii) aggiungere un substrato organico comprendente acido acetico o suoi sali, oppure glucosio;
- iii) aggiungere CO₂;
- iv) lasciare reagire la miscela risultante in condizioni anaerobiche e non-fotosintetiche per almeno 6 ore; e
- v) separare l'acido lattico così ottenuto,

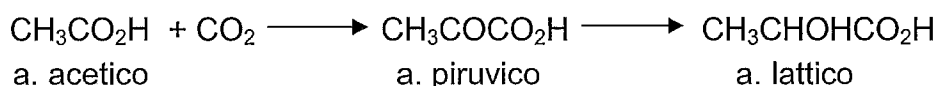
detto glucosio essendo in forma pura oppure in matrici che lo contengono.

Come illustrato in Figura 2, infatti, *T. neapolitana* presenta un nuovo *pathway* biochimico per la sintesi diretta del piruvato da acetil coenzima A (Ac-CoA) e anidride carbonica (CO₂). Il *pathway* è attivato da elevati livelli di CO₂ e rappresenta il primo caso di sequestro di anidride carbonica per accoppiamento con un substrato esogeno (ossia il substrato organico impiegato nel presente procedimento) e rilascio di un prodotto finale, i.e., composto organico di formula (I), in particolare, acido lattico, al di fuori delle cellule. Questo processo corrisponde ad un tipo di assimilazione fermentativa ed eterotrofica.

Come si vedrà meglio dall'Esempio seguente, in questo caso, la diminuzione di acido acetico e CO₂ è in accordo molare con la sintesi di acido lattico come risultato della sostituzione della decarbossilazione ossidativa del piruvato con una

riduzione NADH-dipendente del piruvato ad acido lattico. Tuttavia, il processo mostra un apparentemente incoerente bilancio di carbonio, che è dovuto alla capacità della coltura anaerobica di sequestrare anidride carbonica mediante meccanismi non ancora del tutto chiariti.

Si fa rilevare che, come mostrato in Figure 2 e 3, la produzione di H₂ per *dark fermentation* è associata al rilascio di acidi organici, quali l'acido acetico, nel mezzo di coltura come prodotti finali della trasformazione metabolica degli zuccheri. L'accumulo di questi metaboliti inibisce la sintesi dell'idrogeno ma il processo è agevolmente ripristinato aggiustando il pH consentendo così di ottenere il consumo completo degli zuccheri. Inoltre, l'elevata pressione parziale di H₂ tende ad inibire la produzione di H₂ stesso deviando il pathway metabolico verso derivati dell'acido piruvico quali acido lattico o alanina. Questo effetto inibitorio è stato sorprendentemente superato, nella presente invenzione, alimentando CO₂ nell'ambiente di reazione. In tal modo, si è osservato che la sintesi di idrogeno e acido acetico frequentemente avviene contestualmente alla produzione di altri acidi organici, tra i quali l'acido lattico (LA) è largamente il più abbondante. L'analisi delle colture cresciute in presenza di solo N₂, come controllo, oppure con CO₂ mostravano che il consumo di glucosio ed il tasso di crescita erano sostanzialmente differenti, come descritto anche nell'Esempio seguente. In effetti, le cellule cresciute con CO₂ mostravano tassi di crescita e consumo di glucosio significativamente superiori (Figura 5a). Allo stesso tempo, si osservava anche un incremento di acido lattico ma non una riduzione della resa di idrogeno. Ciò era sistematicamente dovuto alla sintesi del nuovo pool di piruvato derivante da riciclo dell'acetato (Figura 2). Il processo complessivo include la carbossilazione dell'acetato da parte dell'anidride carbonica a dare piruvato e poi acido lattico, secondo lo schema di reazione:



Bicarbonato o altri sali carbonati sono possibili alternative all'alimentazione di CO₂ pura, anche se nel caso specifico di PFOR codificata dal cluster genetico *porBACD* del batterio *Thermotoga neapolitana*, si osserva una minore efficienza, probabilmente perché questo batterio non possiede meccanismi specifici di

concentrazione di anidride carbonica nelle cellule e quindi è possibile che la CO₂ in forma pura gassosa sia in grado di penetrare nelle cellule mediante meccanismi passivi che risultano invece più difficoltosi nel caso di bicarbonati e carbonati.

Sotto un altro aspetto, l'invenzione concerne l'uso di un enzima avente almeno una regione proteica piruvato:ferredossina ossido reduttasi (PFOR), suo derivato od omologo di sequenza avente una omologia di almeno il 75%, per la sintesi anaerobica e non-fotosintetica di acido lattico, in particolare a partire da anidride carbonica ed acido acetico o suoi sali, oppure almeno un suo precursore metabolico.

Sotto un ulteriore aspetto, la presente invenzione concerne un impianto per l'implementazione del procedimento sopra citato, comprendente:

- almeno un reattore, dotato di ingresso per l'alimentazione della CO₂, ingresso per l'alimentazione del substrato organico, uscita per la raccolta dei prodotti di reazione, ed uscita per la raccolta di gas;
- almeno un dispositivo di separazione dei prodotti di reazione; ed
- almeno un contenitore per la raccolta dell'almeno un composto organico di formula (I) separato.

In Figura 6, è illustrata schematicamente una forma di realizzazione di detto impianto.

È da intendersi che tutti gli aspetti identificati come preferiti e vantaggiosi per il procedimento dell'invenzione sono da ritenersi analogamente preferiti e vantaggiosi anche per l'impianto di produzione ed i relativi usi.

Si riportano di seguito un Esempio di realizzazione della presente invenzione fornito a titolo illustrativo.

Esempio 1.

Produzione di acido lattico mediante il procedimento della presente invenzione

Microorganismi, mezzi e condizioni di coltura – Una coltura anaerobica di batterio *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359) era mantenuto in mezzo *Tn* (d'Ippolito *et al.* 2010) integrato con 25 mM (0.5% wt/v) di glucosio e 0.4% (wt/v) di estratto di lievito/triptone. Il mezzo *Tn* conteneva (g/L): NaCl 10; KCl 0.1; MgCl₂ • 6 H₂O 0.2; NH₄Cl 1.0; K₂HPO₄ 0.3; KH₂PO₄ 0.3; CaCl₂ • 2 H₂O 0.1; cisteina-HCl 1.0; estratto

di lievito 2.0; triptone 2.0; glucosio 5.0; resazurina (indicatore redox) 0.001; H₂O distillata 1 L. Prima della sterilizzazione, il pH è stato aggiustato a 8.0 con 1 M NaOH a temperatura ambiente. Dopo la sterilizzazione, il mezzo era poi integrato con 10 mL/L di sia vitamine (sterilizzate per filtrazione) che soluzioni di elementi in tracce (come da prodotto commerciale 'Medium 141. METHANOGENIUM MEDIUM' di DSMZ). L'ossigeno in eccesso era rimosso riscaldando i reattori batch al tempo stesso facendovi fluire gas privo di ossigeno finché la soluzione diventava incolore.

I batteri (25 mL) erano cresciuti per tutta la notte a 80°C senza agitazione e successivamente usati per inoculare (1.5 mL, 6% v/v) beute chiuse con tappi a tenuta stagna (volume totale 120 mL).

Il batterio *T. neapolitana* era anche cresciuto in un fermentatore di 3,8 litri con un volume di lavoro di 1 litro ed uno spazio di testa di 2,8 litri. Le colture erano mantenute sotto agitazione continua a 250 rpm a 80°C nel mezzo precedentemente descritto. Le colture erano regolarmente alimentate con 30 mL/min di CO₂ o N₂ (controllo). I fermentatori erano inoculati con una coltura in fase logaritmica (6% v/v) e trasferiti dalle beute preparate come sopra descritto. Il pH della coltura era aggiustato a 7,5 con 1 M NaOH a temperatura ambiente ed alimentate con N₂, se non diversamente specificato. Per esperimenti con bicarbonato, era aggiunto sale di sodio (5 mM, 14 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM) sotto condizioni standard (25 mM glucosio e 0.4% wt/v estratto di lievito/triptone) e le colture erano alimentate con N₂. La crescita cellulare era determinata dalla densità ottica (OD) a 540 nm (spettrometro UV/Vis DU 730, Beckman Coulter). Tutti i trasferimenti e i campionamenti delle colture erano effettuati con siringhe ed aghi sterili.

Analisi chimiche – Acido acetico e acido lattico in colture di *T. neapolitana* erano determinate mediante ¹H-NMR con spettrofotometro a 600 MHz (Bruker Avance 400) equipaggiato con Cryoprobe®, impiegando trietilammina cloridrata (TMA) 3.8 M come standard interno. Le misure dei gas (H₂ e CO₂) erano effettuate mediante gas-cromatografia su uno strumento (Focus GC, Thermo Scientific) equipaggiato con un rilevatore a termococonduttività (TCD), integrato ad una colonna impaccata 3 m (Hayesep Q), e N₂ come gas carrier e di riferimento. I campioni erano

quantificati mediante curve di calibrazione fatte tramite gas puri. Nel mezzo di coltura, CO₂ e bicarbonato disciolti erano quantificati mediante gas-cromatografia TDC dopo acidificazione con HCl 6N (2 mL). La concentrazione di glucosio era determinata mediante il metodo dell'acido dinitrosalicilico calibrato sulla soluzione standard di glucosio 2 g/L. La concentrazione proteica era determinata tramite test di Bradford, impiegando una soluzione di sieroalbumina bovina (BSA, 1 g/L) come standard. Le misure erano effettuate sui surnatanti dopo centrifugazione di colture microbiche a 10.000 rpm per 30 min a 5°C.

Esperimenti al carbonio 13 (¹³C) – Sotto condizioni standard, le colture anaerobiche di *T. neapolitana* in 25 ml di mezzo *Tn* erano fatte gorgogliare con un flusso di azoto che portava ¹³CO₂ derivante dalla reazione di carbonato di bario marcato ¹³C (Ba¹³CO₃) con HCl 1N. Un mezzo senza glucosio era impiegato per esperimenti con 25 mM 2-¹³C glucosio o 25 mM 2-¹³C glucosio/14 mM NaH¹³CO₃. Gli altri esperimenti erano effettuati in beute sigillate da 120-ml sotto condizioni standard con mezzo completo integrato con uno dei seguenti componenti: (4.7 mM, 14 mM e 58.3 mM) NaH¹³CO₃; (1.5 mM, 3.5 mM, 7 mM, 14 mM e 28 mM) 2-¹³C-sodio piruvato/14 mM NaH¹³CO₃; (10 mM e 20 mM) 1-¹³C-sodio acetato/14 mM NaH¹³CO₃. Le incubazioni erano effettuate in triplicato a 80°C per 72 h con alimentazione regolare di N₂. NaOH 1M sterile era usato per tamponare il mezzo a pH 7.5. Dopo centrifugazione, i prodotti di fermentazione erano analizzati direttamente in campioni del mezzo mediante NMR (¹H, ¹³C- e ¹³C-¹³C COSY). I surnatanti da campioni di coltura 0.5 ml erano diluiti con 15% D₂O/CD₃OD (1:1 v/v). L'idrogeno era misurato dallo spazio di testa delle beute sigillate mediante gas-cromatografia TCD. I composti marcati erano forniti dai Cambridge Isotope Laboratories (USA).

Analisi Western Blot – Sotto condizioni di mezzo standard, i batteri erano cresciuti in fermentatori da 3L per 72h. Le colture erano regolarmente alimentate con 5 mL CO₂ per 10 minuti ogni 6 h. I mezzi di coltura contenenti una densità cellulare equivalente erano raccolti ad ogni tempo, i.e. 6h, 12h, 24h, 30h, 48h e 72h. Le cellule erano radunate per centrifugazione a 10'000 rpm per 30 min a 5°C. I campioni erano sospesi in un tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM fenil-metil-sulfonil fluoruro) ed omogeneizzati mediante ultrasonicazione (20 KHz, 8 cicli

di 5 min) (Ultrasonic Processor XL). Dopo centrifugazione a 3000 rpm a 5°C per 10 min, il surnatante opalescente era chiarificato per centrifugazione a 20'000 rpm per 1 h a 5°C ed il materiale risultante era dializzato a lungo contro 50 mM Tris-HCl pH 8.0 alla stessa temperatura prima di essere caricato su gel SDS-PAGE (10% acrilammide in gel separatore, 5% acrilammide in gel di impaccamento, Tris-glicina (pH 8.3) - 1.0 g/L SDS come tampone di corsa). I pesi molecolari di 250–10 kDa erano calcolati mediante Precision Plus Protein WesternC Standards (Bio-Rad). Le bande proteiche erano colorate con 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 e de-colorate con una miscela di acqua distillata/metanolo/acido acetico (5:4:1 v/v/v). Le proteine erano trasferite per electroblotting su una membrana PVDF Hybond-P (Amersham) e rilevate usando un anticorpo primario prodotto in coniglio (1:10000) (PRIMM Srl, Milano, Italy) che riconosce la subunità porA della PFOR (149 – 359 aa) di *T. neapolitana* (numero di accesso NCBI YP_002534223.1), come evidenziato in Figura 1 (porzione di sequenza sottolineata). L'anticorpo legato era rilevato mediante IgG anti-rabbit (intera molecola)-fosfatasi alcalina (Sigma Aldrich) come anticorpo secondario (1:15000) e rivelato mediante 50 mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e 50 mg/mL nitrotetrazolio blue cloruro (NBT) (Sigma Aldrich). I blot erano ripetuti tre volte.

RISULTATI

Si è osservato che, quando la miscela di reazione è lasciata reagire tal quale, l'alimentazione di CO₂ su distinte colture di *T. neapolitana* (*TnC*) influenza direttamente i parametri principali di crescita, ad esempio tasso di crescita, consumo di zucchero, tasso e resa di produzione di H₂.

Invece, quando la miscela di reazione è tamponata con NaOH, l'alimentazione di CO₂ su distinte colture di *T. neapolitana* (*TnC*) porta all'accelerazione del processo di fermentazione con il consumo completo dello zucchero nelle prime 24 ore, mentre dopo 48 ore, non si osservavano sostanziali differenze tra le miscele tamponate e le miscele non-tamponate. (v. Figure 5a e 5b)

Sulla base del consumo di zucchero, la produzione di idrogeno delle colture alimentate con CO₂ era sostanzialmente completata in 24 ore, anche se la produzione complessiva era indipendente dalle condizioni di coltura (1612 ml in *TnC* e 1699 ml in *TnN* dopo 48 h). Le concentrazioni di NaHCO₃ (da 5 a 20 mM)

davano gli stessi risultati senza apparenti variazioni di consumo di glucosio e produzione di idrogeno rispetto alle colture *TnN* tamponate con NaOH 1N. Ciò suggeriva che l'effetto sul processo di fermentazione non fosse dovuto al metabolismo diretto di CO₂ ma piuttosto alla capacità di questo gas o dei suoi sali inorganici di mantenere il pH medio (tra 6.0 e 6.5) a condizioni più adatte per la vitalità cellulare. Era pure notevole il fatto che quantità maggiori di sodio bicarbonato (40 mM e oltre) influenzavano negativamente la crescita batterica, riducendo quindi i processi metabolici.

Poiché il piruvato si otteneva per glicolisi dalla fermentazione dello zucchero in *T. neapolitana*, introducendo glucosio marcato con ¹³C, si osservava conseguentemente una rapida e completa marcatura del piruvato e degli altri intermedi glicolitici (Figura 3). L'idrogeno era prodotto durante la fermentazione non-fotosintetica (*dark fermentation* (DF)) mediante idrogenasi ferredossina:NADH dipendente, che trasferisce elettroni ai protoni rilasciando idrogeno molecolare. Il processo era associato alla conversione, che produce NADH, di piruvato in acido acetico (AA), quindi i livelli di quest'ultimo erano linearmente proporzionali alla produzione di idrogeno. D'altra parte il processo era influenzato negativamente da altre reazioni metaboliche che riducevano la disponibilità di piruvato o NADH (e.g. la fermentazione dello zucchero ad acido lattico (LA)). Come riportato in Figura 5c, la fermentazione di acido acetico era confrontabile nelle colture in *TnN* e *TnC* ed era sostanzialmente in accordo con la produzione volumetrica di H₂. Inoltre, l'alimentazione di CO₂ (*TnC*) determinava un drastico incremento nei livelli di acido lattico che infatti risultavano circa cinque volte superiori a quelli in atmosfera di azoto (*TnN*). L'analisi della sintesi dei prodotti di fermentazione in relazione al consumo di zucchero (resa dei prodotti) mostrava che le rese di acido acetico ed idrogeno non erano cambiate in nessuno dei due sistemi valutati (Tabella 1 seguente). Tuttavia, il rapporto in resa LA/AA aumentava di tre volte (da 0.27 a 0.66) da *TnN* a *TnC*, come conseguenza di un netto incremento della produzione di acido lattico promossa dalla CO₂ indipendentemente dalla fermentazione di acido acetico.

Tabella 1. Produzione di acidi organici da colture di *T. neapolitana* integrate con glucosio ed alimentate con N₂ (*TnN*) o CO₂ (*TnC*)

Coltura	Acido acetico (mM)		Acido lattico (mM)		Acido acetico (mM)/ Acido lattico (mM)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>TnN</i>	22.1 ± 2.6	34.9 ± 13.0	4.5 ± 1.0	7.4 ± 2.9	5.1	4.9
<i>TnC</i>	30.6 ± 6.8	33.4 ± 5.8	20.9 ± 10.2	24.9 ± 9.1	1.7	1.6

T. neapolitana tollera bicarbonato di sodio (NaHCO_3) in concentrazioni tra 5 mM e 20 mM, essendo 14 mM la concentrazione preferita per produrre AA (18.2 ± 6.4 mM), LA (18.2 ± 0.4 mM) e H_2 (886 mL/h). Sopra 20 mM, il sale diminuiva significativamente la fermentazione batterica che era pressoché soppressa in corrispondenza di concentrazioni superiori a 40 mM (Tabelle 2 e 3 seguenti). L'aggiunta di 14 mM NaHCO_3 induceva un aumento di fermentazione lattica rispetto alle condizioni *TnN* standard, ma al tempo stesso riduceva l'evoluzione dell'idrogeno. Tuttavia, la spinta sulla produzione di LA dovuta a NaHCO_3 era significativamente più ridotta di quella osservata con l'alimentazione di CO_2 (24.9 ± 9.1 mM). Malgrado la variazione evidente della sintesi biochimica di idrogeno, e acido lattico in condizioni sperimentali diverse (Figura 5d), l'analisi della conversione del glucosio rivelava che la resa di AA (1.75 ± 0.13 con NaHCO_3 , 1.82 ± 0.09 con CO_2 , 1.92 ± 0.21 in condizioni standard) non erano sostanzialmente influenzate dal bicarbonato 14 mM.

Tabella 2. Produzione di H_2 da fermentazione di glucosio 25 mM tramite colture di *T. neapolitana* alimentate con N_2 e integrate con bicarbonato di sodio o 14 mM bicarbonato di sodio / anidrasi carbonica (*TnN* + CA).

Coltura	Consumo zucchero %		Tasso produzione H_2 , mL/L/h		Rese produzione H_2 , mol H_2 /mol glu	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>TnN</i> + 14 mM NaHCO_3	56.2 ± 6.3	90.6 ± 2.7	30.1 ± 2.4	18.5 ± 0.9	2.0 ± 0.07	1.7 ± 0.07
<i>TnN</i> + 20 mM NaHCO_3	53.9 ± 0.3	82.8 ± 3.5	16.2 ± 5.2	14.5 ± 5.8	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2
<i>TnN</i> + 40 mM NaHCO_3	10.0 ± 2.1	22.0 ± 1.9	16.1 ± 2.7	8.3 ± 1.3	2.9 ± 0.4	2.7 ± 0.6
<i>TnN</i> + CA	31.7 ± 3.7	75.0 ± 6.4	31.0 ± 3.1	25.3 ± 2.9	2.9 ± 0.3	2.0 ± 0.05

Tabella 3. Produzione di acidi organici da fermentazione di glucosio 25 mM tramite colture di *T. neapolitana* alimentate con N₂ e integrate con bicarbonato di sodio o 14 mM bicarbonato di sodio / anidrasi carbonica (*TnN* + CA).

Coltura	Acido Acetico (mM)		Acido Lattico (mM)		Acido Acetico (mM)/ Acido Lattico (mM)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>TnN</i> + NaHCO ₃ 14 mM	24.6 ± 3.2	32.1 ± 4.9	11.7 ± 0.7	18.2 ± 0.4	2.1	1.8
<i>TnN</i> + NaHCO ₃ 20 mM	28.8 ± 6.0	39.4 ± 1.2	5.5 ± 3.7	9.8 ± 4.7	6.3	4.6
<i>TnN</i> + NaHCO ₃ 40 mM	12.5 ± 1.2	13.0 ± 4.3	0.7 ± 1.7	0.7 ± 1.5	16.7	18.6
<i>TnN</i> +BCA	23.9	42.4	0.7	3.0	33.5	14.2

L'assorbimento dell'anidride carbonica nelle cellule è stata testata mediante gorgogliamento nella coltura batterica di un flusso di ¹³CO₂ generato dalla reazione di carbonato di bario marcato ¹³C (Ba¹³CO₃) con HCl 1M. L'azoto era usato come gas carrier. Gli spettri ¹³C NMR del brodo di fermentazione di queste colture mostrava la chiara incorporazione dell'anidride carbonica marcata in corrispondenza del C-1 (183.3 ppm) dell'acido lattico (v. NMR in Figura 7a, mentre la Figura 7c è l'NMR del controllo). L'arricchimento specifico era ulteriormente corroborato da esperimenti HMBC che mostravano la correlazione del segnale del ¹³C a 183.3 ppm con i protoni metilici e metilenici dell'acido lattico (rispettivamente a 1.33 e 4.09 ppm). Analogamente, la crescita di *T. neapolitana* su glucosio integrato con bicarbonato di sodio marcato ¹³C (NaH¹³CO₃) 14 mM, come atteso, portava alla produzione specifica di acido lattico 1-¹³C (v. NMR in Figura 7b). La glicolisi scinde il glucosio nel mezzo, convertendo le posizioni del carbonio 1, 2, e 3 (e 6, 5, e 4) rispettivamente in carboni metilici, carbonilici, e carbossilici del piruvato. Di conseguenza, a fronte della predominanza del percorso Embden-Meyerhof, la fermentazione di 2-¹³C₂-glucosio produceva soltanto 1-¹³C₂-acetato e 2-¹³C-lattato in *T. neapolitana* sotto condizioni standard. Per contro, la crescita del batterio termofilo su mezzo *Tn* integrato con 25 mM 2-¹³C-glucosio e 14 mM NaH¹³CO₃ dava l'atteso 1-¹³C acetato, insieme con 1,2-¹³C₂ lattato (v. NMR in Figura 8a). La sintesi di quest'ultimo composto era inequivocabile poiché i carboni vicinali a 69.3 ppm (C-2) e 183.3 ppm (C-1) dell'acido lattico risuonavano come doppietti ($J = 54.6$ Hz) per accoppiamento omonucleare. Ciò provava che il

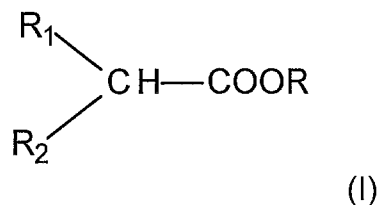
legame tra C-1 e C-2 dell'acido lattico era nuovamente formato per reazione dell'anidride carbonica e di una unità C₂ derivante da glucosio, similmente acetato o sua forma equivalente acetil coenzima A. Non sono stati osservati fenomeni di rimescolamento isotopico (*scrambling*) nei prodotti di fermentazione di *T. neapolitana*, né marcatura di altri carboni di acetato e lattato, prodotti dal batterio. Coerentemente con la marcatura dell'acido lattico, è stata trovata anche una doppia marcatura in corrispondenza di C1 (176.5 ppm, $J = 54.6$) e di C-2 (51.5 ppm, $J = 54.6$ Hz) dell'alanina. Poiché questo amminoacido deriva dalla transaminazione diretta del piruvato, i risultati complessivi indicavano la perdita specifica del carbonio carbonilico del piruvato presumibilmente nella reazione di scambio con l'anidride carbonica presente nell'ambiente.

Le cellule di *T. neapolitana* erano anche in grado di captare 2-¹³C-piruvato aggiunto al mezzo *Tn*. Infatti, il metabolismo di questo precursore portava ad 1-¹³C-acetato ed in misura minore a 2-¹³C-lattato. D'altra parte, esperimenti con 2-¹³C-piruvato 28 mM e NaH¹³CO₃ 14 mM conseguivano acido lattico ed alanina doppiamente arricchiti (v. NMR in Figura 8b), che era lo stesso risultato ottenuto con gli esperimenti di alimentazione di glucosio e anidride carbonica marcati sopra descritti. Il metabolismo del piruvato era semmai sorprendente in un batterio eterotrofico anche se potrebbe essere dovuto al parziale ripristino del pool endogeno di questo acido da parte del substrato esterno. Tuttavia, la sintesi di acido 1,2-¹³C₂ lattico richiedeva necessariamente la decarbossilazione del piruvato ad acetil-CoA seguita dal trasferimento riduttivo di anidride carbonica a quest'ultimo substrato e la nuova sintesi di acido 1,2-¹³C₂ piruvico (v. Figura 3). In vitro, la reazione è catalizzata da piruvato: ferredossina ossidoreduttasi (PFOR). L'uso di ferredossina ridotta, il cui potenziale redox è prossimo a quello del piruvato come ossidante, ha il potenziale per rendere possibile la reazione di coupling, sebbene PFOR sia nota solo in reazioni inverse dal piruvato ad acetil-CoA e CO₂ in condizioni fisiologiche. Al fine di testare la funzione sintetica di PFOR in *T. neapolitana*, il batterio era stato cresciuto in condizioni standard su glucosio integrato con 1-¹³C acetato 20 mM e NaH¹³CO₃ 14 mM. L'analisi NMR del mezzo di coltura rivelava i doppietti diagnostici ($J = 54.6$) a 183.3 e 69.3 ppm per C-1 e C-2 dell'acido lattico doppiamente marcato (v. NMR in Figura 8c). Ciò

provava il coupling di acetato e CO₂ e la sintesi di acido lattico dalla riduzione di un pool transiente di piruvato nuovamente prodotto o forme biochimicamente equivalenti. La PFOR di *T. neapolitana* è un complesso eterotetramerico composto da quattro catene peptidiche chiamate porA, porB, porC and porD (NCBI database accession numbers: YP_002534223.1, YP_002534222.1, YP_002534225.1, YP_002534224.1). *porA*, *porB*, *porC*, e *porD* sono clusterizzate nel genoma di *T. neapolitana* e mostrano elevata omologia a geni aventi funzioni simili in altri membri dell'ordine *Thermotogales*. Per praticità, si fa riferimento esplicitamente alla reazione della piruvato sintasi (*TnPS*), ma genericamente ci si riferisce all'enzima come PFOR. Per verificare la variazione di *TnPS* durante la crescita batterica ed in relazione alla presenza di CO₂, i livelli di PFOR sono stati analizzati in colture di *T. neapolitana* mediante anticorpi policlonali contro il peptide antigenico 149 – 359 (AS) di porA del complesso tetramerico. In accordo con la funzione catalitica riconosciuta di effettuare la decarbossilazione del piruvato ad acetil-CoA, è stato trovato che il segnale di PFOR spariva con il consumo di glucosio in colture sotto N₂ dopo 36 h (Figura 4). Questo risultato era in linea con un feedback positivo del glucosio sull'espressione della proteina. Al contrario, gli immunoblots degli estratti di cellule da colture sotto CO₂ mostravano chiaramente una persistente presenza di PFOR durante l'intero esperimento (72 h) nonostante il rapido consumo di zucchero dopo sole 24 h. Non erano rilevate differenze significative nei livelli della proteina prima e dopo questo punto, suggerendo quindi che CO₂ stimola l'espressione *ex novo* di PFOR ma questa regolazione non è correlata al metabolismo del glucosio e l'espressione di PFOR è indipendentemente indotta dai due fattori.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di almeno un composto organico di formula (I):



in cui

R è H o metallo alcalino,

R₁ è -H, -OH, -O-alchile, -O-CO-alchile, -NH₂, =O, -NH-CO-alchile, -NH-alchile, -SH, -S-alchile, dove alchile è C1-C3 lineare o ramificato,

R₂ è -H, -OH, -NH₂, alchile C1-C6 lineare o ramificato, oppure alchile C1-C6 lineare o ramificato sostituito con almeno un gruppo -OH o -NH₂,

a condizione che R₁ ed R₂ non siano contemporaneamente -H, e

R₂ non è presente, se R₁ è =O,

comprendente le fasi di:

- i) fornire un enzima avente almeno una regione proteica piruvato:ferredossina ossido reduttasi (PFOR), suo derivato od omologo di sequenza avente una omologia di almeno il 75%;
- ii) aggiungere un substrato organico;
- iii) aggiungere CO₂;
- iv) lasciare reagire la miscela risultante in condizioni anaerobiche per almeno 6 ore; e
- v) separare l' almeno un composto organico di formula (I) così ottenuto.

2. Il procedimento di rivendicazione 1, in cui detta regione proteica piruvato:ferredossina ossido reduttasi (PFOR), è codificata da batteri *Thermotogales*.

3. Il procedimento di rivendicazione 2, in cui detti batteri sono del genere *Thermotoga* o *Thermosipho*.

4. Il procedimento di rivendicazione 3, in cui detti batteri sono della specie *Thermotoga neapolitana*.
5. Il procedimento di rivendicazione 4, in cui detta PFOR è una proteina tetramerica avente numeri di accesso NCBI YP_002534223.1, YP_002534222.1, YP_002534225.1, YP_002534224.1.
6. Il procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui detto substrato organico comprende un composto di formula R_2CH_2COOR , in cui R ed R_2 sono come definito in rivendicazione 1, oppure almeno un suo precursore metabolico, ossia un monosaccaride, un disaccaride, un polisaccaride, o loro miscele.
7. Il procedimento di rivendicazione 6, in cui detto substrato organico comprende acido acetico o suoi sali, oppure almeno un suo precursore metabolico monosaccaridico.
8. Il procedimento di rivendicazione 7, in cui detto almeno un precursore metabolico monosaccaridico è glucosio.
9. Il procedimento di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui detto almeno un composto organico di formula (I) è acido lattico.
10. Uso di un enzima avente almeno una regione proteica piruvato:ferredossina ossido reduttasi (PFOR), suo derivato od omologo di sequenza avente omologia di almeno il 75%, per la sintesi anaerobica e non-fotosintetica di acido lattico, a partire da anidride carbonica ed acido acetico o suoi sali, oppure almeno un suo precursore metabolico.

Subunità porA (SEQ ID NO.1): YP_002534223.1

MKMERVVERVAVTGAEAVANAMRQIEPDVVAAYPITPQTPIVEYFARFVADGI
VKTEMIPVESEHSAMSAVVGAAAAGARAMTATSANGLALMHEIVYIAASYRLPI
VMPVVNRALSGPINIHCDHSDAMAERDSGWIQLFAETNQEAYDFTILAVRLAE
HSDVRLPVMVNLDGFILSHGVEPVEFYPPDDLVKKFVGELKPMYPLLGTEHPV
TWGPLDLYDYYFEHKRQQIEAMENVKKVFPEIAKEFEETFGRKYWFVEPYKL
DDAEHVMVALGSTNSTIKYVVDELREEGHKVGALKIWMFRFPFKEQLQELLN
GRKSVIVLDRAVSFGAEAPLYEAVKSSLYEVAARPSLGSYVYGLGGRDIKPE
HIRKAFEDAINGNLIADQRYLGLRE

Subunità porB (SEQ ID NO.2): YP_002534222.1

MPVNIKQLAQEFDKKEIGITQGHRLCPGCGAPITVKFVMMIARHLGYEPVVGLA
TGCLEVSTTIYPYTAWSVPYIHNAFENVAATMSGVETAYRALKNKGKIPEDKKY
AFIAFGGDGGTYDIGLQSLSGMLERGHKVLVLYDNEGYMNTGNQRSGSTPP
GSDTTTAPVGKKLPKGVQLKKNIVEIVA AHENVYAATAALSEPMDFFAKVEKAL
NFDGPSFLAVLSPCVRFWRVND DKTVEISKLA VETKYWPLYEVERGVYRVTR
KPRQFKPVEEFLRAQGRFRKLLSRPDAKEIIDELQEYVDRRWERLLALEEATK
DKPIR

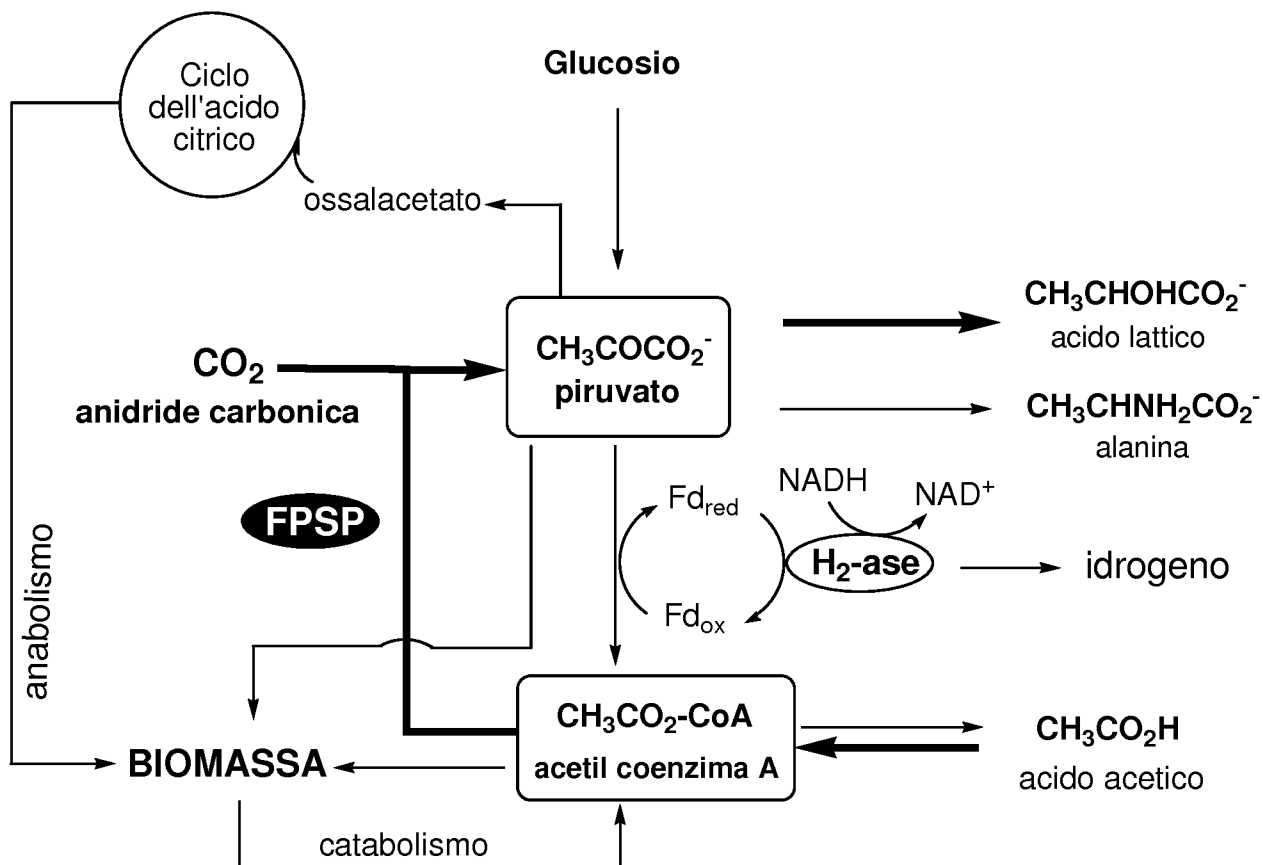
Subunità porC (SEQ ID NO.3): YP_002534225.1

MCKEVQSMPVAKKYFEIRWHGRAGQGAKSASQMLAEAALEAGKFVQAFPEY
GAERTGAPMRAFNRI GDEYIRVRS AIENPDVVVIDETLLSPAIVEGLSEDGILL
VNTVKDFEFVRQKTGFNGKICVVDATDIALQEIKRGIPNTPMLGALVRVTGVVP
LEVIEKRIEKMFGKKFPQEVVEANKRALRRGYEEVKCSE

Subunità porD (SEQ ID NO.4): YP_002534224.1

MSLKSWKEIPIGGVIDKPGTAREYKTGTWRVMRPILHKEKCIDCMFCWLYCPD
QAIVQEGGIMKGFNYDYCKGCGLCANVCPKQAIEMRPETEF LGEEG

Figura 1



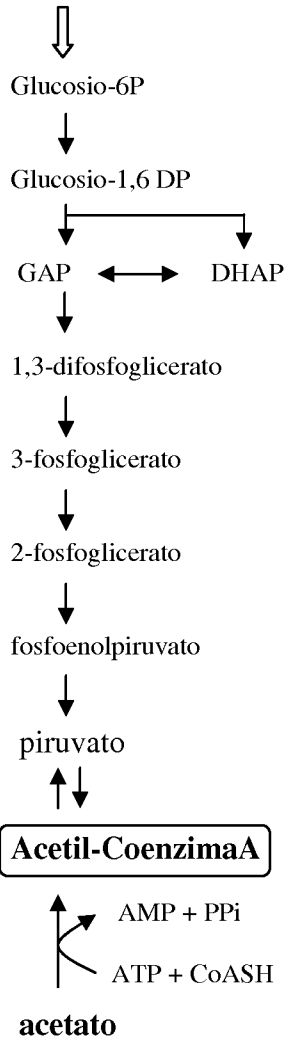
$\text{H}_2\text{-ase}$ = idrogenasi; Fd_{red} = ferredossina ridotta; Fd_{ox} = ferredossina ossidata

FPSP = processo (linee in grassetto) di fissazione fermentativa di anidride carbonica in acido lattico

Figura 2

(a)

Glucosio



(b)

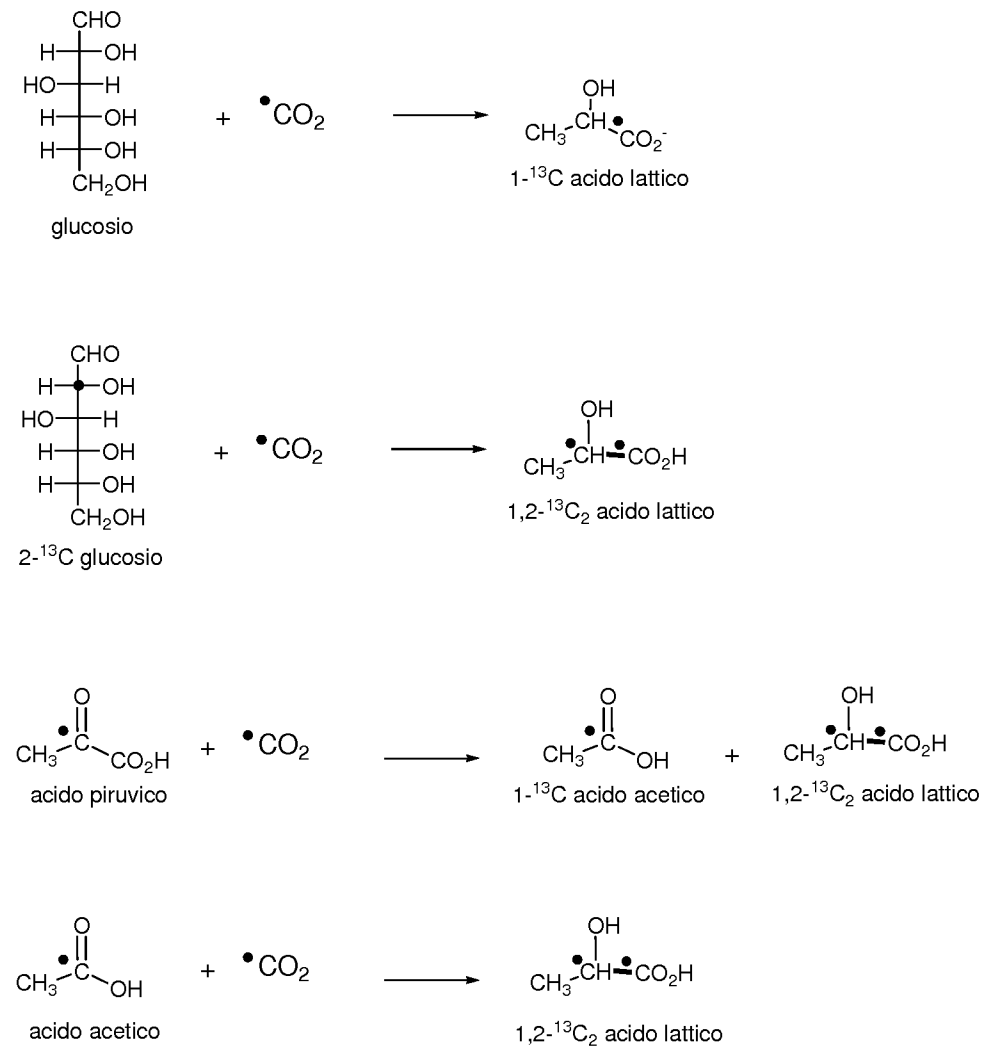


Figura 3

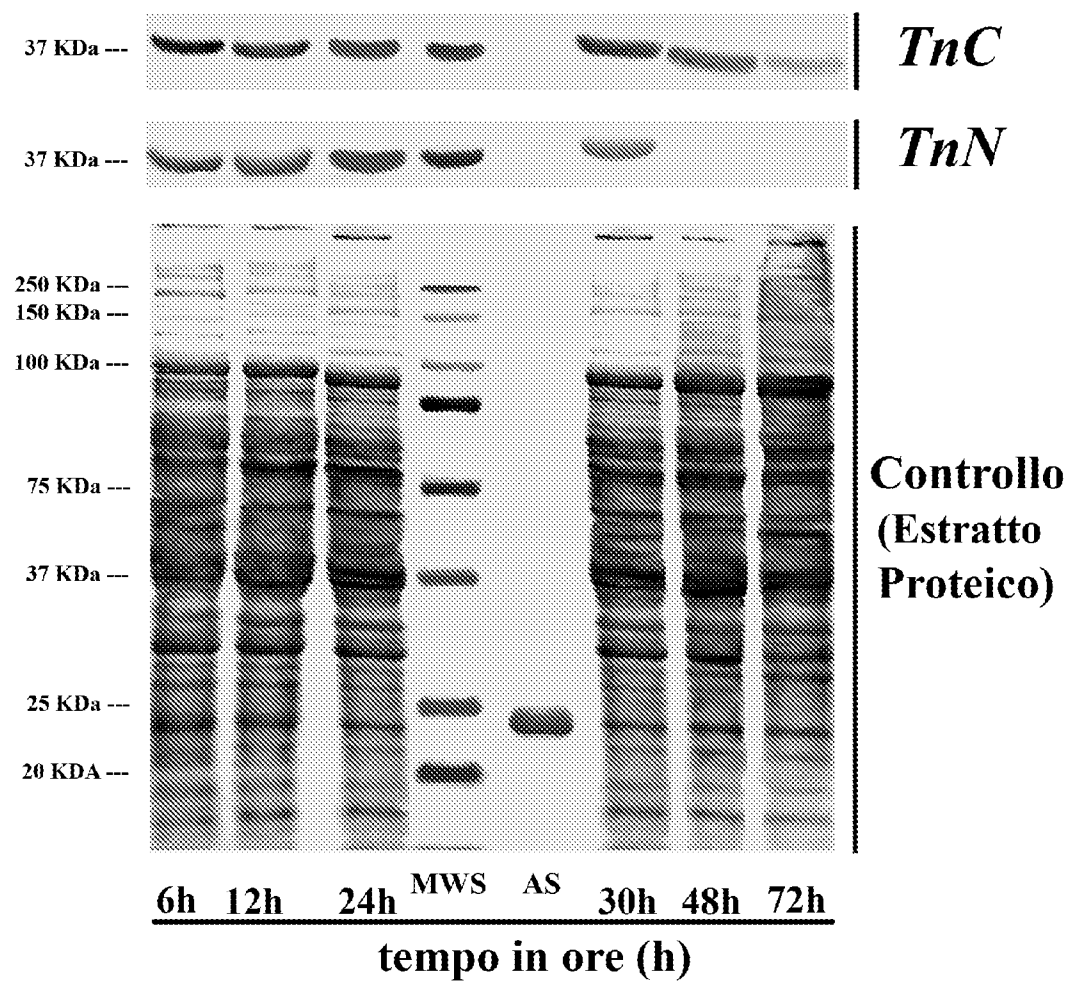


Figura 4

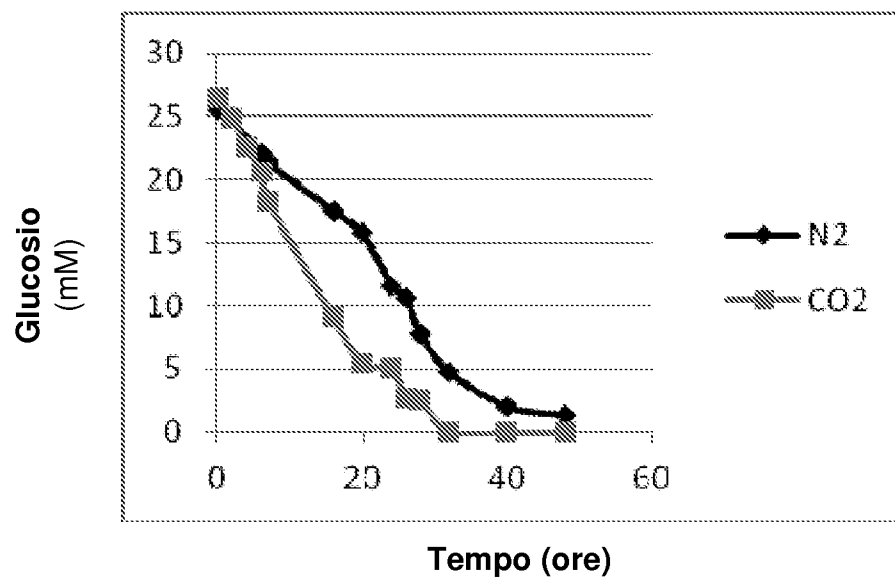


Figura 5a

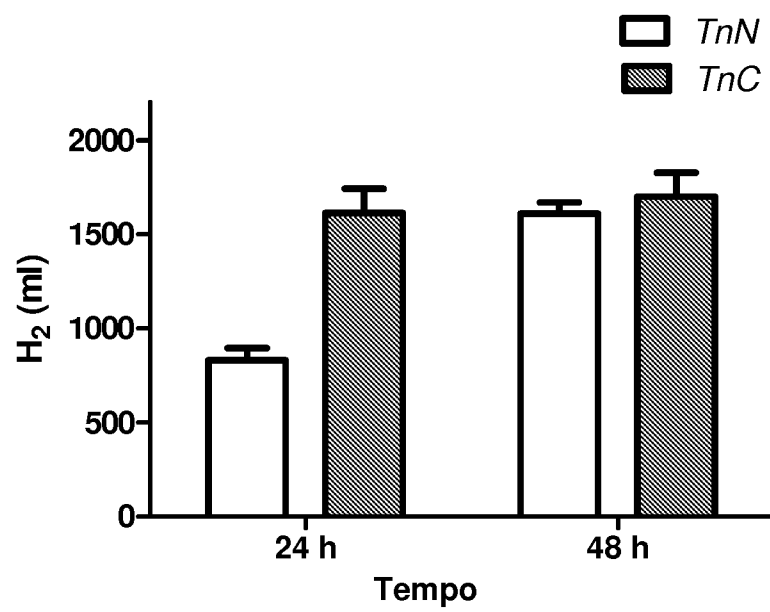


Figura 5b

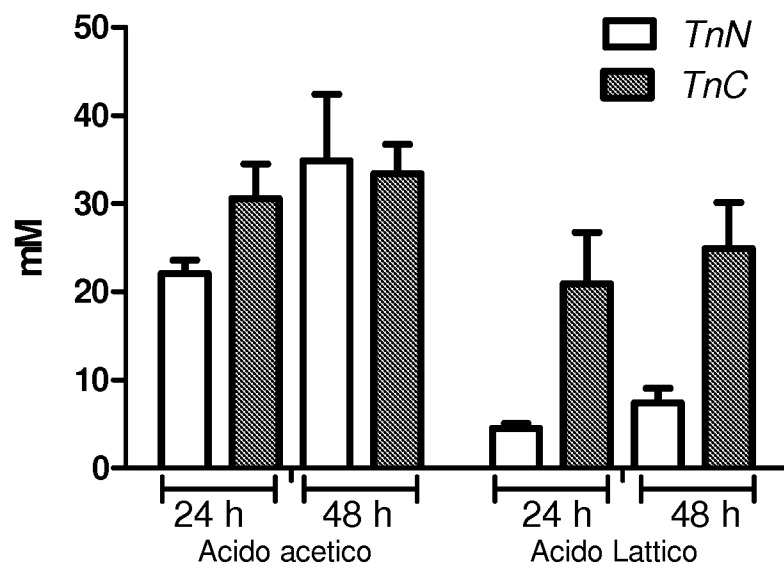


Figura 5c

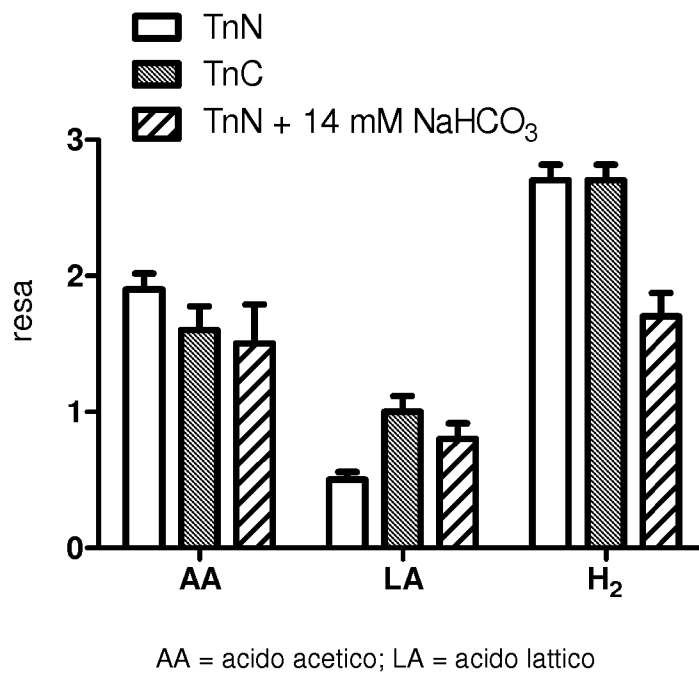


Figura 5d

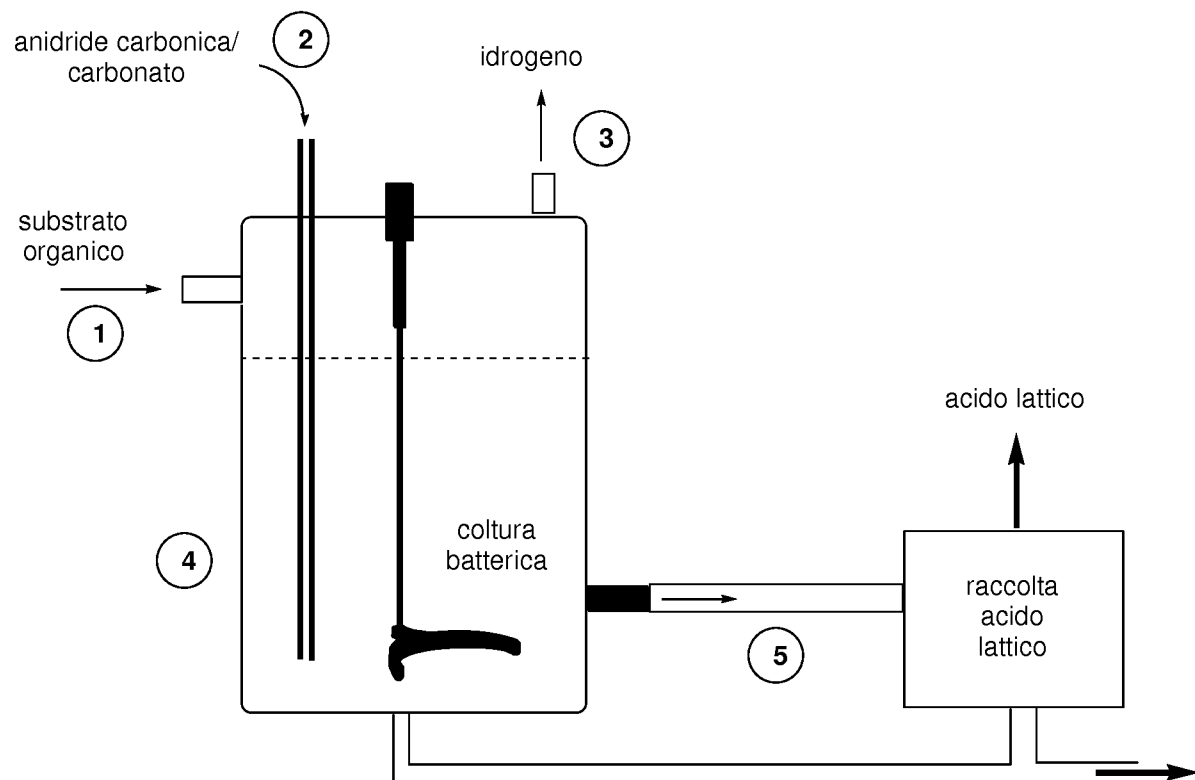


Figura 6

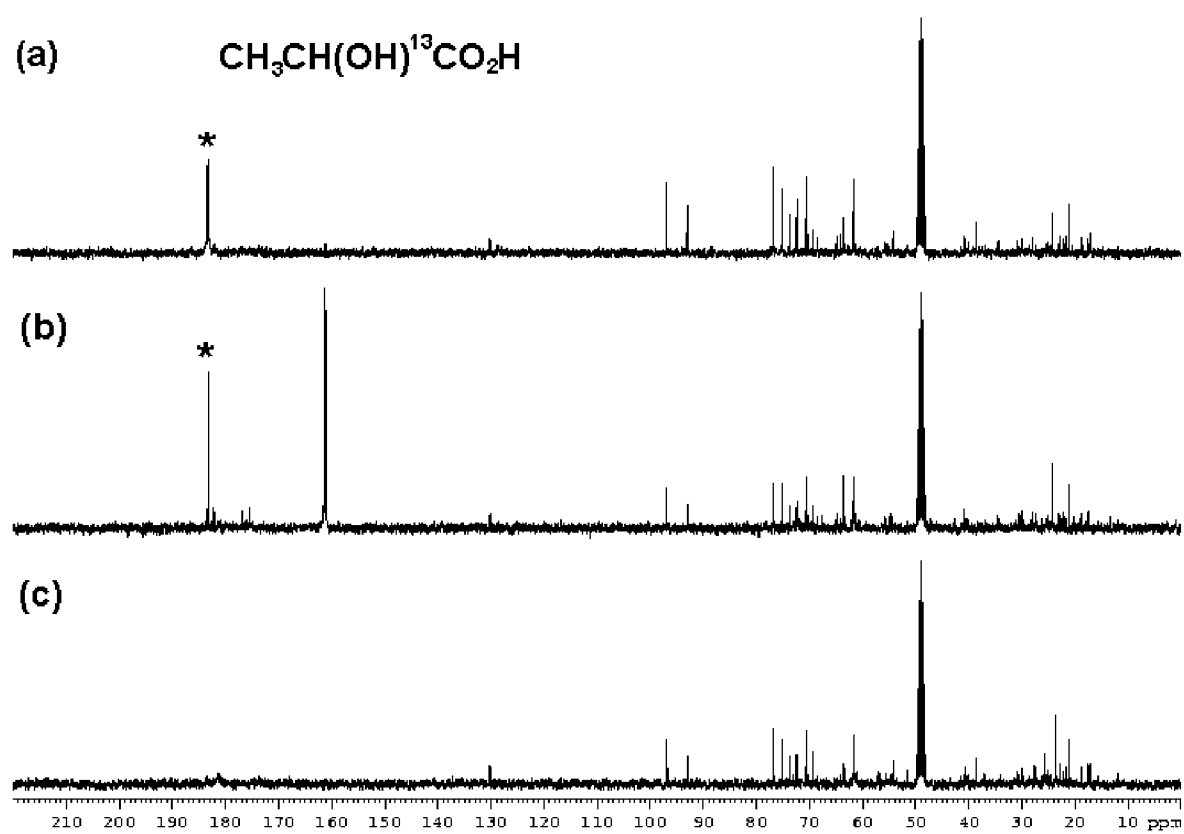


Figura 7

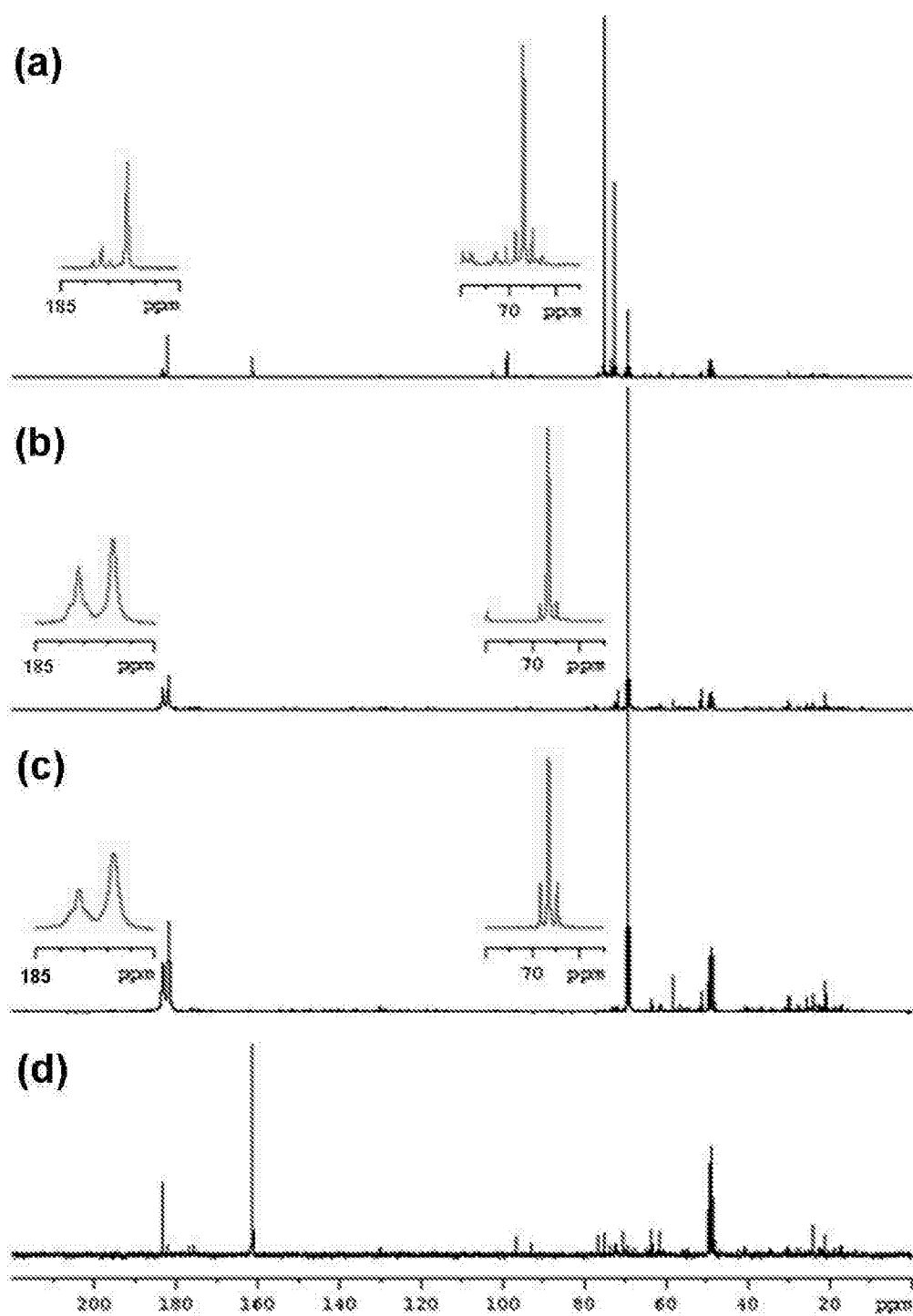


Figura 8