(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 723 349**

(51) Int. Cl.:

C12P 7/40 (2006.01)
B01D 53/62 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2014** **PCT/EP2014/062892**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014** **WO14202695**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2014** **E 14738408 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019** **EP 3011040**

(54) Título: **Procedimiento para almacenar hidrógeno gaseoso mediante la producción enzimática de metanoato (formiato)**

(30) Prioridad:

18.06.2013 EP 13172411

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.08.2019

(73) Titular/es:

JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN (100.0%)
Grüneburgplatz 1
60323 Frankfurt am Main, DE

(72) Inventor/es:

MÜLLER, VOLKER y
SCHUCHMANN, KAI

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 723 349 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

Procedimiento para almacenar hidrógeno gaseoso mediante la producción enzimática de metanoato (formiato)

La presente invención se refiere a un procedimiento para almacenar hidrógeno gaseoso según el conjunto de reivindicaciones adjuntas. La HDCR (reductasa de dióxido de carbono dependiente de hidrógeno) y/o su complejo se deriva preferentemente de *Acetobacterium woodii*.

Antecedentes de la invención

Una alternativa prometedora a los combustibles fósiles es el hidrógeno. A través de su reacción con el oxígeno, el hidrógeno libera energía de manera explosiva en los motores térmicos o de manera silenciosa en las celdas de combustible para producir agua como su único subproducto. El hidrógeno es abundante y está distribuido generosamente a lo largo del mundo independientemente de las fronteras nacionales. El almacenamiento de hidrógeno en una forma de alta densidad de energía que vincula de manera flexible su producción y su eventual uso es un elemento clave de la economía del hidrógeno.

Boddien et al. (en: CO2-"Neutral" Hydrogen Storage Based on Bicarbonates and Formates. Angewandte Chemie International Edition, 2011 50: 6411-6414) describen un catalizador de rutenio generado in situ que facilita la hidrogenación selectiva de bicarbonatos y carbonatos, así como CO_2 y base, para dar formiatos y también la deshidrogenación selectiva de los formiatos a bicarbonatos. Las dos reacciones pueden acoplarse, conduciendo a un sistema de almacenamiento de hidrógeno reversible.

El documento KR 2004/0009875 describe un procedimiento electroquímico de preparación de ácido fórmico usando dióxido de carbono, llevando a cabo de esta manera simultáneamente la reducción del dióxido de carbono y la conversión del dióxido de carbono a materias orgánicas útiles. El procedimiento comprende la reducción electroquímica del dióxido de carbono usando ácido fórmico deshidrogenasa o bacterias anaeróbicas productoras de ácido fórmico deshidrogenasa y un portador de electrones en el que se produce una oxidación/reducción reversible a un potencial eléctrico de -400 a -600 mV, en el que la concentración del portador de electrones es de 5 a 15 mM; las bacterias anaerobias se seleccionan de entre Clostridium thermoaceticum, Clostridium thermoauthotrophicum, Acetobacterium woodii, Acetogenium kivui, Clostridium aceticum, Clostridium ljungdahlii, Eubacterium limosum o una mezcla de las mismas; el portador de electrones se selecciona de entre metilviologeno, N,N,dietil-4,4-bipiridilo, N,N-diisopropilil-4,4-bipiridilo, 4,4-bipiridilo o una mezcla de los mismos; la temperatura de reducción es de 20 a 70°C; y la reducción del pH es de 6,0 a 7,0.

El documento WO 2011/087380 describe procedimientos para mejorar la eficiencia de la captura de carbono en la fermentación microbiana de un sustrato gaseoso que comprende CO y/o H_2; en el que dicho procedimiento comprende aplicar un potencial eléctrico a través de la fermentación. Además, se refiere a la mejora de la eficiencia de la captura de carbono en la fermentación microbiana de un sustrato gaseoso que comprende CO y/o H_2 para producir alcohol o alcoholes y/o ácido o ácidos.

Los procedimientos catalíticos pueden usarse para convertir gases que consisten principalmente en CO y/o CO e hidrógeno (H_2) en una diversidad de combustibles y productos químicos. Los microorganismos pueden usarse también para convertir estos gases en combustibles y productos químicos. Estos procedimientos biológicos, aunque generalmente más lentos que las reacciones químicas, tienen varias ventajas sobre los procedimientos catalíticos, incluyendo una mayor especificidad, mayores rendimientos, menores costos energéticos y mayor resistencia al envenenamiento.

La capacidad de los microorganismos para crecer en CO como única fuente de carbono se descubrió por primera vez en 1903. Más tarde, se determinó que era una propiedad de los organismos que usan la ruta bioquímica de la acetil coenzima A (acetil CoA) de crecimiento autótrofo (conocida también como ruta Wood-Ljungdahl y la ruta de la deshidrogenasa de monóxido de carbono/acetil CoA sintasa (CODH/ACS)). Se ha demostrado que un gran número de organismos anaeróbicos, incluyendo organismos carboxidotróficos, fotosintéticos, metanogénicos y acetogénicos, metabolizan el CO a diversos productos finales, concretamente, CO_2, H_2, metano, n-butanol, acetato y etanol. Cuando se usa CO como única fuente de carbono, la totalidad de dichos organismos producen al menos dos de estos productos finales. La ruta Wood-Ljungdahl de la fijación del CO_2 anaeróbico con hidrógeno como reductor se considera un candidato para la primera ruta de mantenimiento de la vida en la Tierra, ya que combina la fijación de dióxido de carbono con la síntesis de ATP mediante un mecanismo quimiosmótico.

Schuchmann et al. (bacterial electron-bifurcating hydrogenase. Journal of Biological Chemistry, 7 de Septiembre de 2012; 287(37):31165-71) describen una [FeFe]-hidrogenasa multimérica de *A. woodii* que contiene cuatro subunidades (HydABCD) que catalizan la reducción de ferredoxina basada en hidrógeno. Aparentemente, la hidrogenasa multimérica de *A. woodii* es una hidrogenasa de conversión de energía soluble que usa bifurcación de electrones para impulsar la reducción de ferredoxina endergónica mediante el acoplamiento a la reducción NAD^+ exergónica.

Schiel-Bengelsdorf y Dürre (en: Pathway engineering and synthetic biology using acetogens, FEBS Letters, 2012, 586, 15,

2191) describen bacterias anaerobias acetogénicas que sintetizan acetil-CoA a partir de CO_2 o CO. Su modo de metabolismo autótrofo ofrece la posibilidad biotecnológica de combinar el uso de sustratos abundantemente disponibles con la reducción de gases de efecto invernadero. Varias empresas han establecido ya plantas piloto y de demostración para convertir los gases de desecho en etanol, un importante biocombustible y un producto natural de muchos acetógenos. Ahora, los enfoques de ADN recombinante han abierto la puerta a la construcción de acetógenos, la síntesis de importantes productos químicos industriales y biocombustibles, tales como acetona y butanol. De esta manera, hay disponibles novedosas plataformas de producción microbiana que ya no compiten con las materias primas nutricionales.

El documento WO 2011/028137 describe un sistema de biorreactor para la fermentación de un sustrato gaseoso que comprende CO y opcionalmente H_2, o CO_2 y H_2, a uno o más productos, incluyendo ácido o ácidos y/o alcohol o alcoholes.

El documento US 7.803.589 describe una microorganismo *Escherichia coli*, que comprende una modificación genética, en el que dicha modificación genética comprende la transformación de dicho microorganismo con moléculas de ácido nucleico bacteriano exógenas que codifican las proteínas cobalamida corrinoide/proteína hierro-azufre, metiltransferasa, deshidrogenasa de monóxido de carbono, acetil-CoA sintetasa, acetil-CoA sintetasa disulfuro reductasa e hidrogenasa, de manera que la expresión de dichas proteínas aumenta la eficiencia de la producción de acetil-CoA a partir de CO_2, CO o H_2, o una combinación de los mismos.

Poehlein et al. (An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. PLoS One. 2012;7(3): e33439. doi: 10.1371/journal.pone.0033439) describen que la síntesis de acetato a partir de dióxido de carbono e hidrógeno molecular se considera la primera ruta de asimilación de carbono en la Tierra. Combina la fijación de dióxido de carbono a la acetil-CoA con la producción de ATP a través de una membrana celular energizada. La manera en la que la ruta se acopla con la síntesis neta de ATP ha sido un enigma. La bacteria anaerobia, acetogénica *Acetobacterium woodii* usa una versión antigua de esta ruta sin citocromos y quinonas. Genera un potencial de iones de sodio a través de la membrana celular mediante la ferredoxina:NAD oxidorreductasa (Rnf) con capacidad de translocar sodio. La secuencia del genoma de *A. woodii* resuelve el enigma: descubre la Rnf como la única enzima con capacidad de translocar iones acoplada a la ruta y desentraña un metabolismo diseñado para producir ferredoxina reducida y superar las barreras energéticas gracias a enzimas solubles bifurcadoras de electrones.

Hull et al., "Reversible hydrogen storage using CO2 and a proton-switchable iridium catalyst in aqueous media under mild temperatures and pressures", Nature Chemistry, (2012), vol. 4, páginas 383 - 388, divulgan un sistema en el que el cambio de pH a través de la adición de ácido regenera el H_2 almacenado.

Peters et al, "Transient production of formate during chemolithotrophic growth of anaerobic microorganisms on hydrogen", Current Microbiology, (1999) y STRAUB, "Fermentative Acetatproduktion durch Homoacetat-Gärung bzw. Acetacetatbildung", Disertación, Alemania, (2012) divulga la producción transitoria de formiato por *Acetobacterium woodii*.

Tal como se ha indicado anteriormente, el hidrógeno es una de las fuentes de energía futura más discutidas. Los procedimientos de producción de hidrógeno son bien conocidos, pero el almacenamiento y el transporte del gas es un problema no resuelto. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos nuevos y eficaces para proporcionar nuevas maneras de almacenar hidrógeno, en particular directamente desde la fase gaseosa.

Según un primer aspecto del mismo, el objeto de la presente invención se resuelve proporcionando un procedimiento para almacenar hidrógeno gaseoso, que comprende las etapas de producir metanoato (formiato) poniendo en contacto hidrógeno gaseoso con dióxido de carbono en presencia de una reductasa de dióxido de carbono dependiente de hidrógeno (HDCR) que cataliza la conversión directa de H_2 y CO_2 en HCOOH y, almacenar de esta manera dicho hidrógeno gaseoso, en el que dicha HDCR es parte de un complejo enzimático con una proteína accesoria de formiato deshidrogenasa, una proteína de transferencia de electrones y una subunidad que alberga la el sitio activo característico de una [FeFe]-hidrogenasa.

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la HDCR y un complejo enzimático respectivo convierten el H_2 + CO_2 gaseosos directamente en formiato en la reacción $H_2 + CO_2 \rightarrow HCOOH$. El presente sistema biológico funciona entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 40°C y a presión normal. Además, el procedimiento tiene una alta tasa de conversión, en comparación con los catalizadores químicos conocidos. Además, preferentemente no se debe proporcionarse energía adicional.

Debido a que la reacción se produce muy cerca del equilibrio termodinámico, en la reacción inversa, el hidrógeno puede liberarse fácilmente del formiato.

En contraste con el H_2 a convertir, el CO_2 puede proporcionarse en el procedimiento en forma tanto gaseosa como sólida. Es preferente un procedimiento de la presente invención, en el que el CO_2 se proporciona en forma de hidrogeno carbonato (HCO_3) (véase también la Figura 3).

Es preferente un procedimiento de la presente invención, en el que el procedimiento no implica una reducción electroquímica, en particular de dióxido de carbono. No es necesario proporcionar energía eléctrica y, en particular, no hay implicado ningún medio para proporcionar un potencial eléctrico a un biorreactor.

Es preferente un procedimiento de la presente invención, en el que dicha HDCR se selecciona de entre una enzima bacteriana, tal como, por ejemplo, FdhF1 (Nº de Acc. YP_005268500, SEQ ID No.1) o FdhF2 (Nº de Acc. YP_005268502, SEQ ID No.2) de *Acetobacterium woodii*. También son preferentes las enzimas formiato deshidrogenasa que son al menos un 65% idénticas a las enzimas FdhF1 y/o FdhF2, más preferentemente al menos un 70%, incluso más preferentemente al menos un 80%, y más preferentemente al menos un 90% idénticas a las enzimas FdhF1 y/o FdhF2 al nivel de aminoácidos. Los ejemplos preferentes se seleccionan de entre la formiato deshidrogenasa-H de Clostridium difficile 630 (Nº de Acc. YP_001089834.2), la formiato deshidrogenasa h de Clostridium difficile CD196 (Nº de Acc. YP_003216147.1), la formiato deshidrogenasa de Clostridium sp. DL-VIII (Nº de Acc. WP_009172363.1), la formiato deshidrogenasa de Clostridium arbusti (Nº de Acc. WP_010238540.1), la formiato deshidrogenasa de Clostridium ragsdalei (Nº de Acc. gb|AEI90724.1), la formiato deshidrogenasa H de Paenibacillus polymyxa E681 (Nº de Acc. YP_003871035.1), la formiato deshidrogenasa-H de Clostridium difficile 630 (Nº de Acc. YP_001089834.2), la formiato deshidrogenasa h de Clostridium difficile CD196 (Nº de Acc. YP_003216147.1), la formiato deshidrogenasa H de Treponema primitia ZAS-2 (Nº de Acc. ADJ19611.1), la formiato deshidrogenasa H de Clostridium carboxidivorans P7 (Nº de Acc. ADO12080.1), y la formiato deshidrogenasa I de Clostridium ragsdalei (Nº de Acc. gb|AEI90722.1), y mezclas de los mismos. Todas estas proteínas deben entenderse como "homólogas" de las proteínas de *Acetobacterium woodii*, tal como se describe en la presente memoria.

En el procedimiento según la presente invención, dicha HDCR es parte de un complejo enzimático con una proteína accesoria de formiato deshidrogenasa, tal como, por ejemplo, FdhD de *Acetobacterium woodii*, una proteína de transferencia de electrones, tal como, por ejemplo, HycB1 o HycB2 de *Acetobacterium woodii*, y una subunidad que alberga el sitio activo característico de una [FeFe]-hidrogenasa, tal como, por ejemplo, HydA2 de *Acetobacterium woodii.* Son preferentes también las proteínas accesorias de formiato deshidrogenasa y/o las proteínas de transferencia de electrones y/o las proteínas de la [FeFe]-hidrogenasa, que son al menos el 65% idénticas a las enzimas HydA2, FdhD, HycB1 y/o HycB2, más preferentemente al menos el 70%, más preferentemente al menos el 80%, y más preferentemente al menos el 90% idénticas a la enzima HydA2, FdhD, HycB1 y/o HycB2 al nivel de aminoácidos, y muestras una actividad de transferencia de electrones, una actividad accesoria de proteína deshidrogenasa, o una actividad de la [FeFe]-hidrogenasa. Estas proteínas deben entenderse también como "homólogas" de las proteínas de *Acetobacterium woodii*, tal como se describe en la presente memoria.

Particularmente preferente es un procedimiento según la presente invención, en el que dicha HDCR es parte del complejo enzimático que comprende FdhF1/2, HycB1/2/3 e HydA2. Por lo tanto, FdhF reduce el CO_2 a formiato, los electrones son proporcionados por HydA2, la subunidad de la oxidación H_2. Más preferentemente, la HDCR es un complejo proteico compuesto por las subunidades FdhF1/FdhF2, HycB1/HycB2, HydA2 e HycB3. Más preferentemente, la HDCR se selecciona de entre uno de los complejos que comprenden FdhF1, HycB1, HydA2 e HycB3, o el complejo que comprende FdhF2, HycB2, HydA2 e HycB3.

Más preferente es un procedimiento según la presente invención, en el que dicho procedimiento comprende además una inhibición del metabolismo celular para metabolizar adicionalmente el formiato, tal como un agotamiento o reducción de Na, por ejemplo, usando ionóforos de sodio. Cuando el metabolismo de la célula se inhibe (y/o se deteriora), el formiato tal como se produce ya no puede reaccionar más, y se produce de manera ventajosa como producto final. Para la inhibición del metabolismo energético, pueden usarse todas las sustancias conocidas por las personas expertas, y los ejemplos se seleccionan de entre todos los inhibidores de la ATPasa, tales como la DCCD (diciclohexilcarbodiimida), metales pesados como los iones de plata, iones de cobre, etc., todos los agentes de desacoplamiento del potencial de membrana, tales como protonóforos como TCS (3,3',4',5-tetraclorosalicilanilida), K-ionóforos, tales como valinomicina, yoduro de propilo como inhibidor de reacciones dependientes del cobalto, ayuno de fosfato, que ralentiza la síntesis de ATP y agentes tensioactivos o sustancias que destruyen la integridad de la membrana de la célula. Es importante el bloqueo de una enzima y/o de una etapa del metabolismo energético, ya que esto conduce a una acumulación del producto intermedio. Debido a que la HDCR es independiente del metabolismo energético y no requiere portadores de electrones o energía externos, el proceso de formación de formiato puede continuar. Por supuesto, este fenómeno puede aplicarse tanto a reacciones en células enteras como a reacciones in vitro. Además, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la síntesis de acetil-CoA puede detenerse en el formiato, si se agota el Na. Entonces, el sistema (por ejemplo, las bacterias) produce casi exclusivamente formiato, que se usa para el almacenamiento de hidrógeno. El agotamiento puede conseguirse usando tampones y/o medios sin sodio y/o usando ionóforos de sodio, tales como, por ejemplo, Monensina, Gramicidina A o ETH 2120 (N,N,N',N'-tetraciclohexil-1,2-fenilendioxidiacetamida, Selectophore™, disponible comercialmente.

En otro aspecto de la presente invención, la presente invención se basa de esta manera en el sorprendente descubrimiento de la inhibición del metabolismo celular para metabolizar adicionalmente formiato, tal como por agotamiento de Na (por ejemplo, usando ionóforos de sodio) puede usarse de manera ventajosa para producir formiato.

En esta realización, el agotamiento de Na conduce a una acumulación de formiato en base al bloqueo efectivo de la producción de los productos posteriores al formiato. De esta manera, la presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de metanoato (formiato) que comprende poner en contacto dióxido de carbono en presencia de una reductasa de dióxido de carbono dependiente de hidrógeno (HDCR), tal como se define en las reivindicaciones, bajo condiciones que inhiben el metabolismo celular para metabolizar adicionalmente formiato, tal como, por ejemplo, bajo agotamiento de Na, a un potencial eléctrico de -300 a -600 mV (por ejemplo, usando electrodos) y/o en presencia de un portador de electrones. La concentración del portador de electrones puede ser de 5 a 15 mM, y el portador de electrones puede seleccionarse de entre metilviologeno, N,N,-dietil-4,4-bipiridilo, N,N-diisopropilil-4,4-bipiridilo, 4,4-bipiridilo o una mezcla de los mismos. Preferentemente, dicha HDCR se selecciona de entre una enzima bacteriana, tal como, por ejemplo, FdhF1 o FdhF2 de *Acetobacterium woodii*. Más preferentemente, la HDCR es un complejo proteico compuesto por al menos una de las subunidades FdhF1/FdhF2, HycB1/HycB2, HydA2 y HycB3. Más preferentemente, la HDCR se selecciona de entre uno de los complejos que comprenden FdhF1, HycB1, HydA2 y HycB3, o el complejo que comprende FdhF2, HycB2, HydA2 y HycB3. Más preferentemente, dicho procedimiento se realiza bajo temperatura y presión ambiente estándar, o entre aproximadamente 20ºC y aproximadamente 40ºC y presión normal. Otras realizaciones preferentes de este procedimiento son análogas a las descritas en la presente memoria para el primer aspecto de la presente invención.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere entonces a un procedimiento según la presente invención, que comprende además la etapa de convertir monóxido de carbono en dióxido de carbono usando una CO deshidrogenasa, por ejemplo, una CO deshidrogenasa bacteriana, tal como AcsA de *Acetobacterium woodii*, y una ferredoxina. Son preferentes también las enzimas CO deshidrogenasa que son al menos 65% idénticas a la enzima AcsA, más preferentemente al menos 70%, todavía más preferentemente al menos 80%, y más preferentemente al menos 90% idénticas a la enzima AcsA al nivel de aminoácidos, y muestran una actividad CO deshidrogenasa. Todas estas proteínas deben entenderse como "homólogas" de las proteínas de *Acetobacterium woodii*, tal como se describe en la presente memoria.

En este aspecto de la presente invención, se encontró además sorprendentemente que la enzima reductasa de dióxido de carbono dependiente de hidrógeno (HDCR) puede usar también monóxido de carbono (vía ferredoxina) como donante de electrones para la reducción de CO_2 a formiato. De esta manera, esto permite el uso ventajoso de gas de síntesis (por ejemplo, como materia prima de alimentación) para el procedimiento. Por supuesto, este aspecto de la invención puede realizarse también bajo las condiciones y utilizando el complejo y las enzimas descritos anteriormente para el uso "directo" de CO_2. Además, este aspecto del procedimiento de la invención puede usarse para eliminar el CO de las fases gaseosas y, de esta manera, puede constituir un procedimiento de descontaminación de los gases contaminados (o corrompidos) con CO.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere, de esta manera, a un procedimiento de descontaminación de gases contaminados o corrompidos con CO que comprende realizar un procedimiento según la invención tal como se ha indicado anteriormente, y se define en las reivindicaciones 5-7, usando dicho gas contaminado o corrompido con CO como un sustrato. Preferentemente, dicho gas contaminado o corrompido con CO es un gas de síntesis.

En los procedimientos según la presente invención, pueden usarse tanto enzima o enzimas purificadas (o parcialmente purificadas) como células bacterianas. De esta manera, los procedimientos según la presente invención pueden realizarse in vitro, in vivo y/o en cultivo, por ejemplo, en tampón de imidazol (véase más adelante).

Más preferente es un procedimiento según la presente invención, que se realiza en un biorreactor en una operación continua o por lotes. Los procedimientos y los dispositivos respectivos son conocidos por la persona experta (y se describen, por ejemplo, en Demler y Weuster-Botz; Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by Acetobacterium woodii. Biotechnology and Bioengineering, Febrero de 2011; 108(2):470-4). De esta manera, todavía otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un organismo bacteriano recombinante que comprende una modificación genética en un procedimiento según la invención, en el que dicha modificación genética comprende una transformación de dicho microorganismo con moléculas de ácido nucleico bacteriano exógenas que codifican para al menos una proteína. seleccionada de entre las proteínas FdhF1, FdhF2, FdhD, HycB1, HycB2, HydA2 y HycB3, de manera que la expresión de dichas proteínas aumenta la eficiencia de dicho organismo bacteriano recombinante en la producción de formiato a partir de CO_2 y/o CO y H_2, en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9. Más preferentemente, los ácidos nucleicos codifican al menos una de las subunidades de HDCR FdhF1/FdhF2, HycB1/HycB2, HydA2 y HycB3. Más preferentemente, los ácidos nucleicos codifican las proteínas FdhF1, HycB1, HydA2 y HycB3, o las proteínas FdhF2, HycB2, HydA2 y HycB3. Más preferente es un procedimiento según la presente invención, que comprende además la expresión (recombinante) de los genes de maduración de la hidrogenasa, así como para una biosíntesis de cofactor de la formiato-deshidrogenasa (por ejemplo, descrito en Kuchenreuther JM, Grady-Smith CS, Bingham AS, George SJ, Cramer SP, et al. (2010) High-Yield Expression of Heterologous [FeFe] Hydrogenases in Escherichia coli. PLoS ONE 5(11): e15491. doi: 10.1371/journal.pone.0015491).

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una reductasa de dióxido de carbono dependiente de

hidrógeno (HDCR), en el que dicha HDCR es parte de un complejo enzimático con una proteína accesoria de formiato deshidrogenasa, una proteína de transferencia de electrones y una subunidad que alberga el sitio activo característico de una [FeFe]-hidrogenasa; por ejemplo, una enzima bacteriana, como por ejemplo FdhF1 o FdhF2 de *Acetobacterium woodii* u homólogos de los mismos en un procedimiento según la presente invención, tal como se describe en la presente memoria. Es preferente un uso en el que dicha HDCR es parte de un complejo enzimático, por ejemplo, con una proteína accesoria de formiato deshidrogenasa, tal como, por ejemplo, FdhD de *Acetobacterium woodii*, una proteína de transferencia de electrones, tal como, por ejemplo, HycB1 o HycB2 de *Acetobacterium woodii*, y una subunidad que alberga el sitio activo característico de una [FeFe]-hidrogenasa, tal como, por ejemplo, HydA2 de *Acetobacterium woodii*, u homólogos de los mismos. Más preferente es un uso según la presente invención en el que dicho complejo comprende además una CO deshidrogenasa, tal como, por ejemplo, una CO deshidrogenasa bacteriana, tal como, por ejemplo, AcsA de *Acetobacterium woodii*, y una ferredoxina, u homólogos de la misma. Más preferentemente, la HDCR es un complejo proteico compuesto por al menos una de las subunidades FdhF1/FdhF2, HycB1/HycB2, HydA2 y HycB3. Más preferentemente, la HDCR se selecciona de entre uno de los complejos que comprenden FdhF1, HycB1, HydA2 y HycB3, o el complejo que comprende FdhF2, HycB2, HydA2 y HycB3.

Figuras:

La Figura 1 muestra las producciones de formiato usando catálisis de células completas. Suspensiones celulares de *A. woodii* (1 mg/ml) se incubaron usando una fase gaseosa de 0,8 x 10^5 Pa de H_2 y 0,2 x 10^5 Pa de CO_2 (A). La adición del ionóforo Na+ ETH2120 (30 µM) da lugar a la producción de formiato hasta 8 mM y la producción de acetato se detiene (B).

La Figura 2 muestra la producción de formiato usando $HCO3^-$ o CO_2 como sustrato. Suspensiones celulares de *A. woodii* (1 mg/ml) se incubaron usando una fase gaseosa de 0,8 x 10^5 Pa de H_2 y 0,2 x 10^5 Pa de CO_2 o 1 x 10^5 Pa de H_2 con $KHCO_3$ 300 mM.

La Figura 3 muestra la relación de la concentración final de formiato con el HCO_3^- inicial. Suspensiones celulares de *A. woodii* (1 mg/ml) se incubaron con cantidades crecientes de HCO_3^- inicial y una fase gaseosa de 1 x 10^5 Pa de H_2.

Los números de ID de secuencia 1 a 8 muestran las secuencias de aminoácidos de las enzimas FdhF1, HycB1, FdhF2, HycB2, FdhD, HycB3, HydA2 y AcsA de *A. woodii*, respectivamente.

Ejemplos

Mediciones con la HCDR aislada

Para la purificación de HCDR, *A. woodii* (DSM 1030) se hizo crecer a 30ºC bajo condiciones anaeróbicas en matraces de 20-1 litros usando fructosa 20 mM a una OD_{600} de ~2,5. Todos los tampones usados para la preparación de extractos celulares y la purificación contenían DTE 2 mM y resazurina 4 µM. Todas las etapas de purificación se realizaron bajo condiciones estrictamente anaeróbicas a temperatura ambiente en una cámara anaeróbica llena con 100% de N_2 y 2-5% de H_2. El extracto libre de células se preparó tal como se ha descrito anteriormente (Schuchmann et al., Journal of Biological Chemistry, 7 de Sep. de 2012; 287(37):31165-71).

Las membranas se eliminaron mediante centrifugación a 130.000 g durante 40 minutos. Parte del sobrenadante que contenía la fracción citoplásmica con aproximadamente 1.600 mg de proteína se usó para una purificación adicional. Se añadió sulfato de amonio (0,4 M) a la fracción citoplásmica. La mitad de esta muestra se cargó en una columna de fenil-sefarosa de alto rendimiento (1,6 cm x 10 cm) equilibrada con tampón A (Tris/HCl25 mM, $MgSO_4$ 20 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 0,4 M, 20% glicerol, pH 7,5). La actividad formiato deshidrogenasa dependiente de metilviologeno eluyó aproximadamente $(NH_4)_2SO_4$ 0,33 M en un gradiente lineal de 120 ml de 0,4 M a 0 M $(NH_4)_2SO_4$. Esta etapa se repitió con la segunda mitad de la muestra en una ejecución separada para obtener más proteína, ya que, de lo contrario, grandes cantidades de la actividad se eluían en el flujo. Las fracciones recogidas de ambas ejecuciones se diluyeron a una conductividad por debajo de 10 mS/cm con tampón C (Tris/HCl 25 mM, $MgSO_4$ 20 mM, glicerol al 20%, pH 7,5) y se aplicó a una columna de Q-Sepharose de alto rendimiento (2,6 cm x 5 cm) equilibrada con tampón C. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 160 ml de NaCl de 150 mM a 500 mM. La formiato deshidrogenasa se eluyó en aproximadamente 360 mM de NaCl. Las fracciones recogidas se concentraron usando ultrafiltración en tubos de VIASPIN de 100 kDa y se aplicaron a una columna Superose 6 10/300 GL pre-empaquetada equilibrada con tampón C y se eluyó a un caudal de 0,5 ml/min. La actividad formiato deshidrogenasa se eluyó como un pico único. Las fracciones recogidas se almacenaron a 4ºC.

Las mediciones de la actividad de HCDR se realizaron a 30°C con tampón 1 (HEPES/NaOH 100 mM, DTE 2 mM, pH 7,0) en cubetas anaeróbicas de 1,8 ml selladas con tapones de goma, que contenían 1 ml de tampón y una fase gaseosa de 0,8 x 10^5 Pa de H_2 y 0,2 x 10^5 de CO_2. La producción de formiato se midió usando formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii* con NAD 2 mM en el ensayo y se siguió la producción de NADH.

Para las mediciones con ferredoxina como portador de electrones, la ferredoxina se purificó a partir de *Clostridium*

pasteurianum. Para la reducción de ferredoxina, la CO deshidrogenasa de *A. woodii* se purificó y en estos experimentos la fase gaseosa de las cubetas se cambió a 100% de CO (1,1 x 10^5 Pa).

Células enteras

Para los experimentos con células enteras, los presentes inventores usaron suspensiones celulares de *A. woodii* para la conversión de H_2 y CO_2 a formiato El metabolismo energético de *A. woodii* es estrictamente dependiente de los iones de sodio, y la ATP sintasa usa Na^+ como el ión de acoplamiento. De esta manera, omitiendo los iones de sodio en el tampón o añadiendo ionóforos de sodio (los presentes inventores usaron el ionóforo ETH2120 en el presente estudio), es posible desactivar de manera específica el metabolismo energético. Las células suspendidas en tampón de imidazol (imidazol 50 mM, $MgSO_4$ 20 mM, KCl 20 mM, DTE 4 mM, pH 7,0) que contendía NaCl 20 mM convirtieron H_2 + CO_2 a acetato, y solo se produjeron pequeñas cantidades de formiato a partir de una fase gaseosa de 0,8 x 10^5 Pa de H_2 y 0,2 x 10^5 CO_2. Mediante la adición de ETH2120 (30 µM), la producción de acetato cesó casi por completo y el formiato se produjo con una tasa inicial de 2 µmol/min x mg de proteína celular (Figura 1). De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la enzima purificada, se observó también una producción de formiatos cuando el hidrógeno estaba ausente y el donante de electrones era CO, pero con tasas más bajas en comparación con el hidrógeno como donante de electrones.

Los resultados en la Figura 1 demuestran que, en este experimento, se produjo una cantidad máxima de aproximadamente 8 mM de formiato. Los presentes inventores realizaron a continuación un ensayo para determinar si la concentración de formiato final era proporcional a la presión inicial del gas. La concentración final de formiato no aumentó de 0,5 a 2 x 10^5 Pa de H_2 + CO_2. Debido a que los presentes inventores observaron una caída del pH durante el experimento, los presentes inventores examinaron si el pH más bajo era el factor limitante. Un aumento de la concentración de tampón de 50 a 200 mM resultó en una concentración final de formiato de aproximadamente 14 ± 3 mM. Al intercambiar CO_2 con $KHCO_3$, el efecto fue aún más dramático. Usando la base HCO_3^-, el proceso general es casi a pH neutro en comparación con la producción de ácido fórmico a partir de CO_2. El genoma de *A. woodii* codifica para una carboanhidrasa que permite una rápida inter-conversión de CO_2 y HCO_3^-. La Figura 2 muestra la producción de formiato a partir de $KHCO_3$ inicialmente 300 mM (con 1 x 10^5 Pa de H_2) en comparación con el CO_2 como sustrato. Finalmente, se produjeron hasta 184 ± 5 mM de formiato con $KHCO_3$.

La relación de la concentración final de formiato con la concentración inicial de HCO_3^- se muestra en la Figura 3. Hasta 300 mM de HCO_3^-, la concentración final de formiato aumenta con una concentración de sustrato creciente. Además, la concentración final de formiato se ajusta bien al límite termodinámico teórico de la reacción, lo que subraya la independencia de la carboxilación de CO_2/HCO_3^- con relación a otros procesos celulares. A 1 x 10^5 Pa de H_2, el equilibrio termodinámico es aproximadamente [HCO_3^-] = [HCOOH], por lo tanto, concentraciones equimolares de sustrato y producto. A concentraciones de HCO_3^- superiores a 300 mM, esta relación ya no existe y la cantidad final de formiato producida cesó a aproximadamente 300 mM.

Listado de secuencias

<110> Johann Wolfgang Goethe-Universität

<120> Procedimiento para almacenar hidrógeno gaseoso mediante la producción de metanoato (formiato)

<130> U30507WO

<150> EP 13172411.4

<151> 2013-06-18

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 724

<212> PRT

<213> Acetobacterium woodii.

<400> 1

```
Met Lys Lys Lys Val Leu Thr Thr Cys Pro Tyr Cys Gly Ser Gly Cys
1               5                   10                  15

Gln Leu Tyr Leu Asn Val Glu Asp Gly Lys Ile Val Ser Ala Thr Pro
            20                  25                  30

Ala Asp Gly Arg Thr Asn Gln Glu Thr Leu Cys Leu Lys Gly His Tyr
        35                  40                  45

Gly Trp Asp Tyr Leu Asn Asp Pro Gln Ile Leu Thr Lys Arg Leu Thr
    50                  55                  60

Lys Pro Gln Ile Arg Lys Asn Gly Lys Leu Glu Asp Val Glu Trp Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ala Ile Ser Tyr Thr Ala Gln Arg Leu Ser Glu Ile Lys Thr Lys
                85                  90                  95

Tyr Gly Ser Asp Ser Ile Ile Gly Thr Gly Cys Ala Arg Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Asn Glu Ala Asn Tyr Val Met Gln Lys Phe Met Arg Ala Val Ile Gly
        115                 120                 125

Thr Asn Asn Val Asp His Cys Ala Arg Val Cys His Ala Pro Ser Val
    130                 135                 140

Ser Gly Leu Ala Tyr Ser Leu Gly Ser Gly Ala Met Ser Leu Ser Ile
145                 150                 155                 160
```

Pro Glu Ile Glu Asp Ala Lys Leu Leu Leu Ile Phe Gly Tyr Asn Pro
165 170 175

Ala Glu Ser His Pro Ile Val Ala Arg Arg Ile Ile Lys Ala Lys Gln
180 185 190

Lys Gly Ala Lys Ile Ile Val Val Asp Pro Arg Ile Thr Glu Ser Ala
195 200 205

Arg Ile Ala Asp Leu His Leu Gln Ile Lys Gly Gly Ser Asn Leu Ala
210 215 220

Leu Val Gln Ala Met Ala Asn Val Ile Ile Leu Glu Gly Leu Val Asp
225 230 235 240

His Pro Phe Ile Glu Asp His Thr Ser Gly Tyr Glu Glu Tyr Lys Lys
245 250 255

Gln Ile Glu Lys Tyr Pro Pro Glu Tyr Ala Gln Ser Ile Cys His Ile
260 265 270

Pro Ala Asp Thr Ile Arg Gln Ala Ala Arg Gln Tyr Ala Lys Ala Asp
275 280 285

Ser Ala Ala Ile Leu Trp Gly Met Gly Val Thr Gln Phe Gly Gln Ala
290 295 300

Val Asp Val Val Lys Gly Leu Ala Ser Leu Ala Leu Leu Thr Gly Asn
305 310 315 320

Phe Gly Gly Pro Ser Met Gly Val Gly Pro Val Arg Gly Gln Asn Asn
325 330 335

Val Gln Gly Gly Cys Asp Met Gly Ala Leu Pro Asn Cys Tyr Pro Gly
340 345 350

Tyr Gln Asp Val Thr Asp Asp Ile Ile Arg Glu Lys Phe Glu Lys Ala
355 360 365

Trp Gly Val Arg Leu Ser Lys Lys Asn Gly Ile Pro Leu Thr Gln Val
370 375 380

Pro Gln Tyr Val Leu His Glu Lys Asp Glu Lys Lys Lys Ile Arg Ala
385 390 395 400

Tyr Tyr Ile Phe Gly Glu Asp Pro Gly Gln Ser Asp Pro Asp Leu Asn
405 410 415

Asp Met Arg Lys Ala Leu Asp Ala Leu Glu Phe Val Val Val Gln Asp
420 425 430

Ile Tyr Met Asn Lys Thr Gly Leu Lys Ala Asp Val Ile Leu Pro Ala
435 440 445

Thr Ala Trp Gly Glu His Glu Gly Val Cys Thr Cys Ala Asp Arg Gly
450 455 460

Phe Gln Arg Ile Arg Lys Ala Val Glu Pro Lys Gly Asp Leu Lys Pro
465 470 475 480

Asp Trp Glu Ile Ile Ser Leu Val Ser Thr Ala Met Gly Tyr Pro Met
485 490 495

Ser Tyr Lys Asn Thr Lys Glu Ile Trp Asp Glu Met Arg Ser Leu Ser
500 505 510

Pro Leu Phe Phe Gly Ala Thr Tyr Glu Lys Ile Glu Lys Met Gly Gly
515 520 525

Val Leu Trp Pro Cys Lys Asp Glu Ser Met Ala Asp Lys Gly Thr Met
530 535 540

Tyr Leu His Lys Asp Gly Val Phe Ala His Leu Asp Gly Lys Gly Lys
545 550 555 560

Phe Phe Ala Thr Glu Trp Arg Ala Pro Gly Glu Ile Glu Ser Lys Glu
565 570 575

Tyr Pro Phe Ser Leu Ser Thr Val Arg Glu Val Gly His Tyr Ser Val
580 585 590

Arg Thr Met Thr Gly Asn Cys Arg Thr Leu Ser Asn Leu Glu Asp Glu
595 600 605

Pro Gly Trp Ile Gln Met Ser Leu Phe Asp Cys Glu Lys Leu Lys Val
610 615 620

Lys Glu Gly Asp Leu Ile Arg Val Ser Ser Lys Arg Gly Thr Thr Ile
625 630 635 640

Thr Arg Val Lys Pro Thr Glu Arg Val Lys Ala Gly Ala Thr Tyr Met
645 650 655

Thr Tyr Gln Trp Trp Val Gly Ala Cys Asn Asp Leu Thr Val Pro Tyr
660 665 670

Leu Asp Pro Val Ser Asn Thr Pro Glu Ser Lys Tyr Cys Ala Ile Lys
675 680 685

Leu Glu Lys Ile Asp Asp Gln Val Trp Ala Glu Lys Tyr Ile Arg Glu
690 695 700

Ser Tyr Gln Asn Ile Arg Arg Asp Met Gly Ile Asp Ile Val Glu Lys
705 710 715 720

Glu Tyr Arg Leu

<210> 2
<211> 177
<212> PRT
<213> Acetobacterium woodii

<400> 2

Met Asn Tyr Phe Val Lys Gly Asn Pro Asp Leu Cys Ile Gly Cys Arg
1 5 10 15

Thr Cys Met Ile Ser Cys Val Ile Ala His Glu Gly Glu Lys Ile Phe
20 25 30

Gln Met Asn Pro Gly Glu Tyr Val Phe Asn Pro Lys Leu Asp Ile Val
35 40 45

Lys Thr Ala Thr Ile Thr Val Pro Val Gln Cys Lys His Cys Glu Asn
50 55 60

Pro Ala Cys Met Asn Val Cys Pro Val Lys Ala Ile Lys Ile Ile Gly
65 70 75 80

Cys Ala Val Val Val Thr Pro Asp Lys Cys Ile Gly Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Met Ile Ala Cys Pro Tyr Gly Ala Ile Asn Met Ile Lys Ser Ser Asp
100 105 110

Gly Lys Lys Gln Ile Asp Asn Ser Glu Arg Met Val Ala Asn Lys Cys
115 120 125

Asp Leu Cys Val Gly Arg Glu Ala Gly Pro Ala Cys Ile Gln Val Cys
130 135 140

Pro Thr Ala Ser Leu Lys Leu Val Thr Gln Glu Asp Val Glu Ser Ala
145 150 155 160

Ile Ser Ser Lys Arg Ile Ala Ala Ala Val Ser Leu Tyr Gln Val Lys
165 170 175

Asp

<210> 3
<211> 722
<212> PRT
<213> Acetobacterium woodii

<220>
<221> Xaa is Selenocystein
<222> (139)..(139)
<223> Selenocystein

<400> 3

Met Glu Lys Gln Val Leu Thr Thr Cys Ala Tyr Cys Gly Ala Gly Cys
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Leu Asn Val Asn Asp Gly Lys Ile Val Asn Ala Thr Pro
20 25 30

Ala Pro Gly Arg Thr Asn Glu Glu Thr Leu Cys Leu Lys Gly Arg Tyr
35 40 45

Gly Trp Asp Phe Leu Asn Asp Pro Gln Ile Leu Thr Lys Arg Leu Thr
50 55 60

Lys Pro Gln Ile Arg Lys Asn Gly Leu Leu Glu Glu Val Glu Trp Asp
65 70 75 80

Glu Ala Ile Ser Tyr Thr Ala Gly Arg Leu Ser Glu Ile Lys Ala Lys
85 90 95

Tyr Gly Pro Asp Ser Ile Met Gly Thr Gly Ser Ala Arg Gly Pro Gly
100 105 110

Asn Glu Ala Asn Tyr Ile Met Gln Lys Phe Met Arg Ala Ala Ile Gly
115 120 125

Thr Asn Asn Val Asp His Cys Ala Arg Val Xaa His Ala Pro Ser Val
130 135 140

Ala Gly Leu Gln Tyr Ser Leu Gly Ser Gly Ala Met Ser Met Gly Val
145 150 155 160

Pro Glu Ile Glu Asp Ala Lys Leu Leu Phe Ile Phe Gly Tyr Asn Gly
165 170 175

Ala Asp Ser His Pro Ile Val Ala Arg Arg Ile Val Lys Ala Lys Gln
180 185 190

Lys Gly Ala Lys Ile Ile Val Thr Asp Pro Arg Ile Thr Glu Ser Ala
195 200 205

Arg Ile Ala Asp Ile His Leu Gln Leu Lys Gly Gly Ser Asn Met Ala
210 215 220

Leu Val Asn Ala Ile Gly Asn Val Ile Ile Asn Glu Gly Leu Ala Asp
225 230 235 240

Gln Lys Phe Ile Glu Asp His Thr Ser Gly Tyr Glu Glu Tyr Lys Glu
245 250 255

Ile Val Ala Lys Tyr Thr Pro Glu Tyr Ala Glu Val Ile Cys His Val
260 265 270

Pro Ala Gln Leu Ile Arg Glu Ala Ala Arg Ala Tyr Ala Lys Ala Glu
275 280 285

Thr Ser Met Ile Leu Tyr Gly Met Gly Val Cys Gln Phe Ala Gln Ala
290 295 300

Val Asp Val Val Lys Gly Leu Ala Ser Leu Ala Leu Leu Thr Gly Asn
305 310 315 320

Phe Gly Gly Pro Ser Met Gly Ile Gly Pro Val Arg Gly Gln Asn Asn
325 330 335

Val Gln Gly Ala Cys Asp Met Gly Ala Leu Pro Asn Cys Tyr Pro Gly
340 345 350

Tyr Gln Ser Val Thr Asp Asp Ala Val Arg Glu Lys Phe Glu Lys Ala
355 360 365

Trp Gly Val Pro Leu Ser Asn Lys Val Gly Ile Pro Leu Thr His Val
370 375 380

Pro His Arg Val Leu Glu Glu Lys Asp Glu Ala Lys Lys Ile His Ala
385 390 395 400

Tyr Tyr Ile Phe Gly Glu Asp Pro Ala Gln Ser Asp Pro Asp Leu Ala
405 410 415

Glu Ile Arg Glu Thr Leu Glu Lys Val Asp Phe Val Val Val Gln Asp
420 425 430

Ile Phe Met Asn Lys Thr Gly Leu Gln Ala Asp Val Ile Leu Pro Ser
435 440 445

Thr Ser Trp Gly Glu His Glu Gly Ile Tyr Thr Ala Cys Asp Arg Gly
450 455 460

Phe Gln Arg Ile Arg Lys Ala Ile Glu Pro Lys Gly Asp Val Lys Thr
465 470 475 480

Asp Trp Glu Ile Ile Ser Leu Ile Ser Thr Ala Met Gly Tyr Pro Met
485 490 495

His Tyr Gln Asn Thr Lys Glu Ile Trp Asp Glu Met Arg His Leu Thr
500 505 510

Pro Ser Phe Lys Gly Ala Thr Tyr Glu Lys Ile Glu Ala Leu Gly Gly
515 520 525

Val Gln Trp Pro Cys Arg Asp Glu Ser Met Asp Asp Lys Gly Thr Gln
530 535 540

Tyr Leu His Lys Gly Gly Lys Phe Ala His Pro Asp Gly Arg Ala Lys
545 550 555 560

Phe Phe Ser Ala Glu Trp Arg Pro Pro Cys Glu Val Glu Ser Pro Glu
565 570 575

Tyr Pro Phe Ser Leu Ser Thr Val Arg Glu Val Gly His Tyr Ser Val
580 585 590

Arg Thr Met Thr Gly Asn Cys Arg Ala Leu Ala Asn Leu Glu Asp Glu
595 600 605

Pro Gly Trp Ile Gln Met Ser Pro Ala Asp Cys Thr Lys Leu Lys Val
610 615 620

Lys Glu Gly Asp Leu Ile Arg Val Tyr Ser Lys Arg Gly Ser Leu Ile
625 630 635 640

Thr Arg Val Leu Pro Thr Glu Arg Val Lys Ala Gly Ala Thr Tyr Met
645 650 655

Thr Tyr Gln Trp Trp Ile Gly Ala Cys Asn Glu Leu Thr Thr Pro Tyr
660 665 670

Leu Asp Pro Val Ser Asn Thr Pro Glu Ser Lys Tyr Cys Ala Ile Asn
675 680 685

Leu Glu Lys Ile Asp Asp Gln Asp Trp Ala Glu Lys Phe Val Lys Asp
690 695 700

Ser Tyr Glu Arg Ile Arg Thr Asn Met Gly Ile Asp Thr Ala Lys Lys
705 710 715 720

Gly Val

<210> 4
<211> 176
<212> PRT
<213> Acetobacterium woodii

<400> 4

Met Asn Tyr Phe Val Lys Gly Asn Pro Asp Leu Cys Ile Gly Cys Arg
1 5 10 15

Thr Cys Met Ile Gly Cys Val Ile Ala His Glu Gly Glu Lys Ile Phe
20 25 30

Gln Met Asn Pro Gly Glu Tyr Val Phe Asn Pro Lys Leu Asp Ile Val
35 40 45

Lys Thr Ala Thr Ile Thr Val Pro Val Gln Cys Lys His Cys Glu Asn
50 55 60

Pro Ala Cys Met Asn Val Cys Pro Val Lys Ala Ile Glu Ile Ile Asp
65 70 75 80

Asn Ala Val Val Ile Asn Gln Asp Lys Cys Ile Gly Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Met Ile Ala Cys Pro Tyr Gly Ala Val Asp Met Val Val Ser Ser Asp
100 105 110

Gly Lys Lys Gln Thr Asp Asp Ser Asp Arg Ile Val Ala Asn Lys Cys
115 120 125

Asp Leu Cys Ala Gly Ile Glu Gly Gly Pro Thr Cys Ile Arg Val Cys
130 135 140

Pro Thr Ala Ala Leu Lys Leu Val Thr Glu Lys Glu Val Glu Ala Ser
145 150 155 160

Val Thr Asn Lys Arg Lys Ala Ala Ala Val Ser Leu Asn Gln Val Lys
165 170 175

<210> 5
<211> 260
<212> PRT
<213> Acetobacterium woodii

<400> 5

Met Asp Thr Phe Leu Lys Leu Pro Val Val Lys Val Asn Gly Asp Gln
1 5 10 15

Thr Gln Ile Ile Asp Glu Thr Ile Ile Thr Glu Tyr Pro Leu Thr Leu
20 25 30

Tyr Val Asn Asp Lys Val Phe Asn Thr Phe Tyr Cys Thr Pro Gln Asp
35 40 45

Leu Glu Ala Leu Val Val Gly Tyr Leu Met Ser Cys Gly Arg Leu Gly
50 55 60

Ala Lys Gln Asp Ile Leu Gly Leu Glu Ile Ile Arg Lys Lys Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Ile Gln Leu Ala Lys Cys Ala Thr Lys Pro Glu Leu Lys Pro
85 90 95

Val Glu Lys Pro Met Leu Val Lys Ile Glu Asn Ile Tyr Glu Ile Met
100 105 110

Ile Lys Asn Ile Lys Pro Thr Glu Leu Phe Leu Lys Thr Gly Gly Phe
115 120 125

His Asn Val Ala Ile Tyr Asp Asn Lys Lys Glu Ile Ile Thr Met Met
130 135 140

Asp Val Ala Arg His Asn Ala Val Asp Lys Val Leu Gly Tyr Cys Val
145 150 155 160

Leu Asn Glu Ile Asp Cys Arg Asp Lys Met Leu Val Val Ser Gly Arg
165 170 175

Ile Ser Val Asp Met Leu Ile Lys Ala Glu Gln Gly Asn Ile Pro Met
180 185 190

Val Leu Ser Lys Ser Ala Pro Thr Ser Leu Ser Val Ala Arg Ala Asp
195 200 205

Ala Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly Phe Ile Arg Gly Glu Gln Met Asn
210 215 220

Val Tyr Thr His Pro Thr Arg Ile Asp Leu Gly Glu Glu Ala Phe Arg
225 230 235 240

Ala Ile Asn Lys Asn Lys Arg Ile Thr Ser Met Lys Asn Ala Ser Ile
245 250 255

Tyr Leu Arg Ser
260

<210> 6
<211> 186
<212> PRT
<213> Acetobacterium woodii

<400> 6

Met Asn Asn Asn Leu Gly Ser Phe Val Val Ala Cys Asn Asp Gln Cys
1 5 10 15

Thr Gly Cys Lys Ala Cys Glu Ile Ala Cys Phe Thr Val His Asn Gln
20 25 30

Lys Glu Asn Lys Val Ala His Thr Val Gly Thr Val Ala Ile Pro Val
35 40 45

Thr Pro Arg Leu Phe Leu Thr Lys Phe Glu Glu Gln Cys Leu Pro Ile
50 55 60

Gln Cys Lys Gln Cys Glu Asp Ala Pro Cys Leu Asn Ser Cys Ala Ala
65 70 75 80

Lys Ala Ile Thr Lys Val Asp Gly Thr Met Ile Val Asn Glu Met Leu
85 90 95

Cys Ile Gly Cys Lys Asn Cys Met Leu Ala Cys Pro Phe Gly Ala Ile
100 105 110

Glu Met Leu Pro Ile Ala Lys Asn Ala Gln Pro Val Gln Gln Ile Gly
115 120 125

Ser Asp Glu Val Arg Lys Ser Ala Phe Lys Cys Asp Leu Cys Ala Glu
130 135 140

Leu Glu Asp Gly Pro Ala Cys Val Lys Ala Cys Pro His Asp Val Leu
145 150 155 160

Lys Leu Met Asn Leu Glu Glu Asp Arg Lys Glu Lys Ser Ile Arg Ala
165 170 175

Ala Ile Ala Leu Thr Leu Thr Gly Asn Leu
180 185

<210> 7
<211> 459
<212> PRT
<213> Acetobacterium woodii

<400> 7

Met Ile Ile Asn Ile Asp Lys Glu Ile Cys Thr Gly Cys Arg Glu Cys
1 5 10 15

Ala Glu Val Cys Pro Val Ser Ala Ile Glu Gly Glu Pro Gly Lys Gly
20 25 30

Gln Glu Ile Asn Tyr Asp Lys Cys Val Met Cys Gly Gln Cys Val Gln
35 40 45

Lys Cys Lys Ser Tyr Val Ser Ile Val Asp His Gly Val Lys Ala Tyr
50 55 60

Glu Arg Lys Arg Gln Glu Arg Asn Leu Pro Ala Ser Ile Lys Glu Pro
65 70 75 80

Leu Phe Ala Ala Tyr Asn Asn Cys Asn Leu Asp Lys Val Lys Ala Ala
85 90 95

Leu Ala Asp Pro Asp Val Ile Thr Met Val Gln Cys Ala Pro Ala Val
100 105 110

Arg Val Gly Ile Ala Glu Asp Phe Gly Ala Glu Leu Gly Thr Val Ala
115 120 125

Ala Gly Lys Leu Ala Ala Ala Leu His Lys Ile Gly Phe Asp Arg Val
130 135 140

Tyr Asp Thr Asn Phe Thr Ala Asp Leu Thr Ile Met Glu Glu Gly Thr
145 150 155 160

Glu Leu Ile Lys Arg Ile Thr Glu Gly Ala Gly Lys Leu Pro Met Phe
165 170 175

Thr Ser Cys Cys Pro Ala Trp Val Thr Phe Leu Glu Arg Asn Tyr Pro
180 185 190

Asp Gln Lys Asp His Leu Ser Thr Cys Lys Ser Pro Gln Gln Met Gly
195 200 205

Ala Ile Phe Lys Thr Tyr Gly Ala Lys Leu Asp Asn Tyr Asp Pro Ala
210 215 220

Lys Ile Phe Thr Val Ser Val Met Pro Cys Thr Cys Lys Glu Phe Glu
225 230 235 240

Cys Asn Arg Glu Glu Met Asn Ser Ser Gly Tyr Gln Asp Ile Asp Val
245 250 255

Ala Ile Thr Thr Arg Glu Leu Ala Tyr Leu Ile Lys Asp Met Asp Ile
260 265 270

Asp Phe Asn Ala Leu Ala Asp Glu Asp Phe Asp Gln Pro Leu Gly Glu
275 280 285

Tyr Thr Gly Ala Gly Thr Ile Phe Gly Val Thr Gly Gly Val Met Glu
290 295 300

Ala Ala Ile Arg Thr Gly Tyr Glu Leu Ile Thr Gly Lys Pro Ile Pro
305 310 315 320

Asp Ile Asp Val Ser Ala Val Arg Gly Ser Asn Ala Phe Arg Thr Ala
325 330 335

Thr Leu Lys Val Gly Asp Leu Asp Leu Lys Val Gly Ile Val Thr Gly
340 345 350

Leu Ala Asn Val Ile Pro Val Met Glu Asp Leu Lys Ala Gly Lys Leu
355 360 365

Asp Leu His Phe Ile Glu Val Met Thr Cys Pro Val Gly Cys Val Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gln Pro Lys Leu Leu Leu Asp Ser Glu Lys Glu Ala Ala
385 390 395 400

Tyr Glu Ser Arg Thr Lys Gly Ile Tyr Thr His Asp Ala Glu Leu Pro
405 410 415

Ile Arg Lys Ser His Glu Asn Pro Ala Ile Thr Lys Ile Tyr Glu Glu
420 425 430

Tyr Leu Leu Ser Pro Asn Gly Lys Glu Ser His His Met Leu His Thr

435 440 445

His Tyr Gly Thr Gly Glu Asn Ser Phe Gln Lys
450 455

<210> 8
<211> 632
<212> PRT
<213> Acetobacterium woodii

<400> 8

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para almacenar hidrógeno gaseoso, que comprende las etapas de producir metanoato (formiato) poniendo en contacto hidrógeno gaseoso con dióxido de carbono en presencia de una reductasa de dióxido de carbono dependiente de hidrógeno (HDCR) que cataliza la conversión directa de H_2 y CO_2 a HCOOH y, almacenar de esta manera dicho hidrógeno gaseoso, en el que dicha HDCR es parte de un complejo enzimático con una proteína accesoria de formiato deshidrogenasa, una proteína de transferencia de electrones y una subunidad que alberga el sitio activo característico de una [FeFe]-hidrogenasa.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha HDCR se selecciona de entre una enzima bacteriana.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha HDCR se selecciona de entre FdhF1 o FdhF2 de *Acetobacterium woodii*.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho procedimiento se realiza entre 20ºC y 40ºC y a presión normal.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho procedimiento comprende además una inhibición del metabolismo celular para metabolizar adicionalmente el formiato.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la etapa de convertir monóxido de carbono en dióxido de carbono usando una CO deshidrogenasa y una ferredoxina.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la liberación de hidrógeno desde el metanoato según se produce.

8. Procedimiento para descontaminar gases contaminados o corrompidos con CO, que comprende realizar un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 usando dicho gas contaminado o corrompido con CO como sustrato.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho gas contaminado o corrompido con CO es un gas de síntesis.

10. Uso de un organismo bacteriano recombinante que comprende una modificación genética en un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha modificación genética comprende una transformación de dicho microorganismo con moléculas de ácido nucleico bacteriano exógenas que codifican para al menos una proteína seleccionada de entre las proteínas FdhF1, FdhF2, FdhD, HycB1, HycB2, HydA2 e HycB3, de manera que la expresión de dichas proteínas aumenta la eficiencia de producción de formiato a partir de CO_2 y/o CO y H_2.

11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha modificación genética comprende además una transformación de dicho microorganismo con moléculas de ácido nucleico bacteriano exógenas que codifican para AcsA de *Acetobacterium woodii*, de manera que la expresión de dicha proteína aumenta la eficiencia de dicho organismo bacteriano recombinante en la producción de formiato a partir de CO_2 y/o CO y H_2.

12. Uso de una reductasa de dióxido de carbono dependiente de hidrógeno (HDCR) en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha HDCR es parte de un complejo enzimático con una proteína accesoria formiato deshidrogenasa, una proteína de transferencia de electrones y una subunidad que alberga el sitio activo característico de una [FeFe]-hidrogenasa.

13. Uso según la reivindicación 12, en el que dicho complejo comprende además una CO deshidrogenasa.

Figura 1

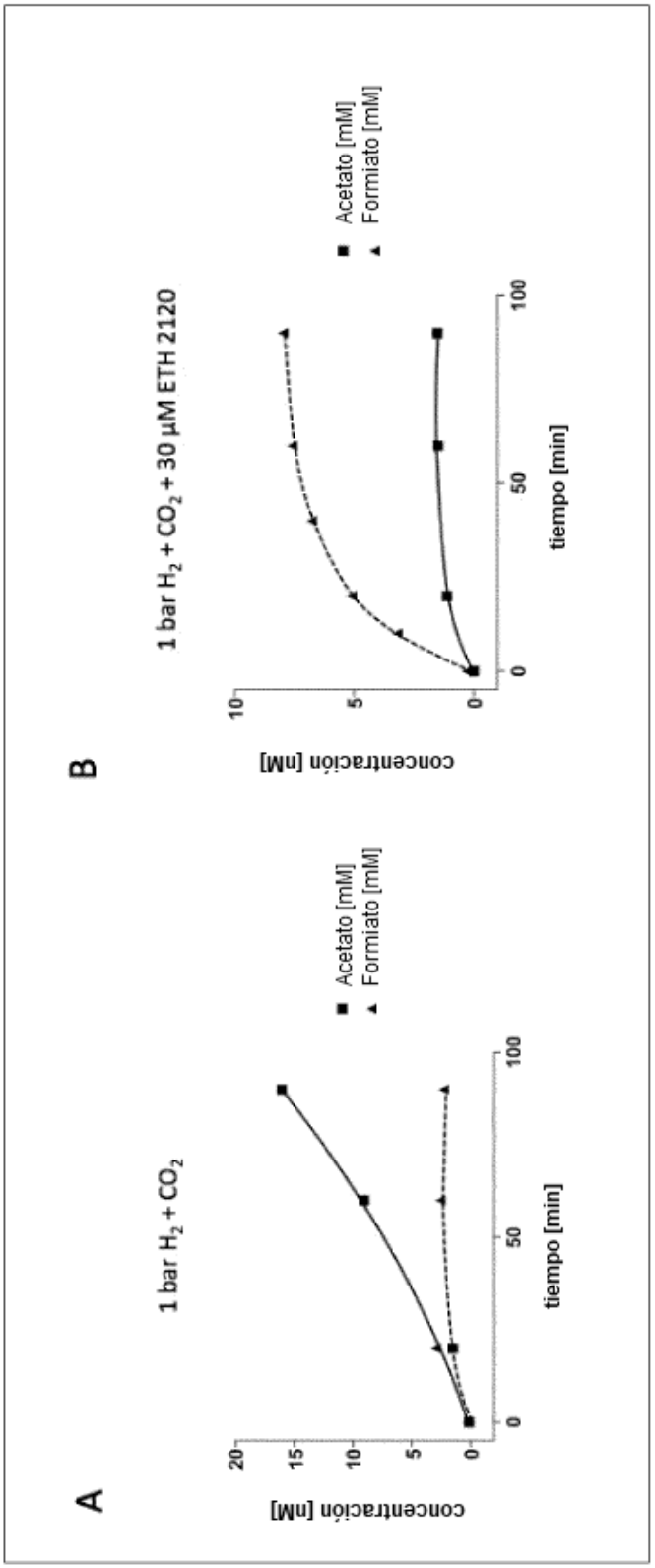
A
1 bar H_2 + CO_2
Acetato [mM]
Formiato [mM]
concentración [mM]
tiempo [min]
B
1 bar H_2 + CO_2 + 30 µM ETH 2120
Acetato [mM]
Formiato [mM]
concentración [mM]
tiempo [min]

Figura 2

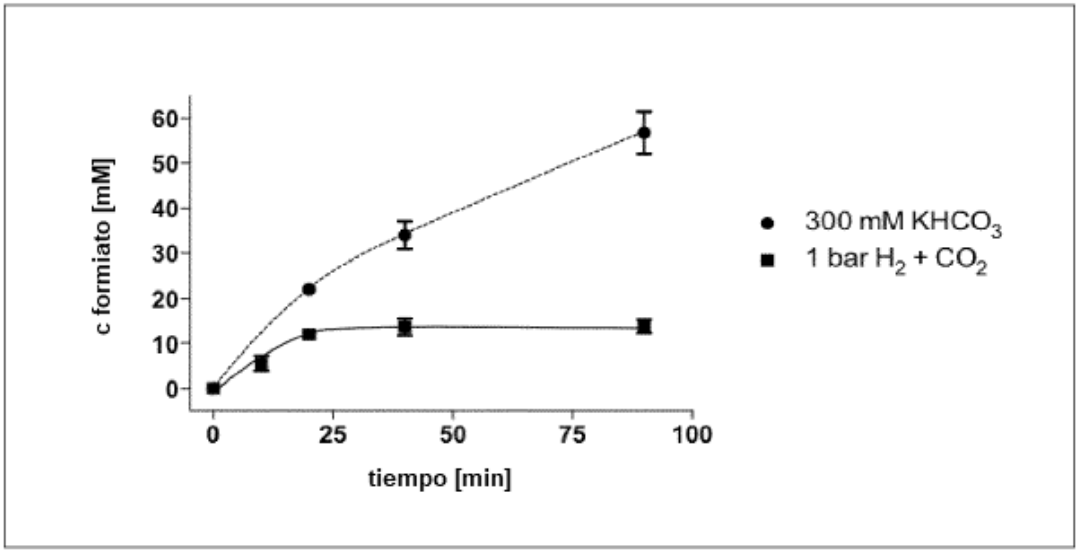
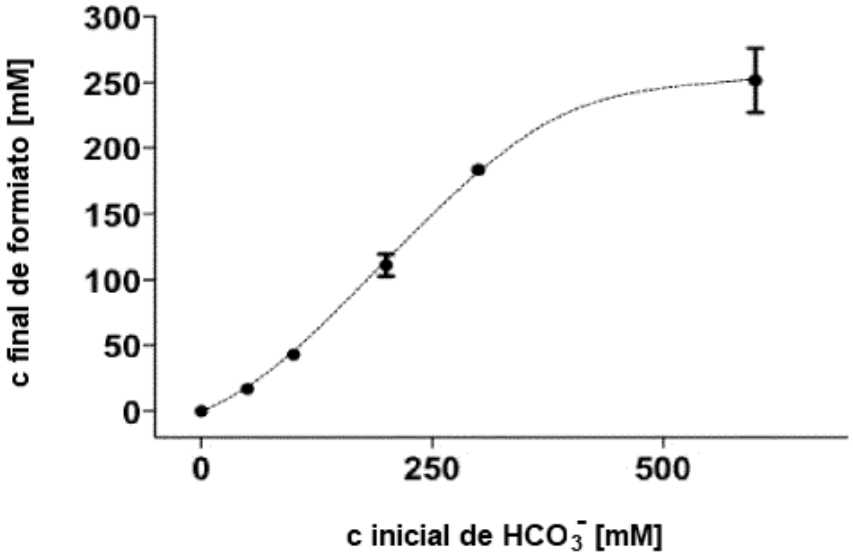
Figura 3