



FORMIATO: UN FUTURO SOSTENIBILE DALLA CO₂

La conversione della CO₂ in formiato mediante enzimi come le formiato deidrogenasi (FDH) rappresenta una strategia promettente per ridurre le emissioni e valorizzare la CO₂. Tuttavia, per rendere il processo sostenibile, sono necessari ulteriori sviluppi per ottimizzare sia l'efficienza di conversione che la rigenerazione del cofattore (NADH o metil viologeno).

Il cambiamento climatico dovuto all'accumulo di CO₂ nell'atmosfera e causato dall'utilizzo preponderante di risorse fossili come fonti di energia, è uno dei problemi più urgenti che l'umanità deve affrontare. La transizione energetica necessaria per rallentare o fermare l'aumento di CO₂ nell'atmosfera e, di conseguenza, il riscaldamento globale, è in corso da alcuni anni, e sta cercando di sviluppare o migliorare tecnologie capaci di convertire fonti rinnovabili di energia (vento, radiazione solare ecc.), in energia elettrica o "fuels". Tuttavia, tecnologie capaci di catturare e riutilizzare la CO₂ prodotta da processi di combustione, sono un campo di ricerca ancora molto attivo. Piuttosto che stoccare o intrappolare la CO₂ per evitare un suo rilascio in atmosfera, molto interessante è la possibilità di riciclare la CO₂ in qualcosa di utile. Tra i prodotti di riduzione della CO₂, il formiato è il derivato più semplice (Fig. 1) ma, nonostante questo, ha un valore commerciale notevole in quanto può essere utilizzato come materia prima [1], oppure come carrier di idrogeno da utilizzare in "Catalytic

Transfer Hydrogenation" [2] in reazioni di riduzione con idrogeno o in celle a combustibile per la produzione di corrente elettrica [3]. Quest'ultimo impiego permetterebbe di stoccare energia ottenuta da fonti rinnovabili intermittenti in un combustibile. La riduzione della CO₂ può essere effettuata attraverso riduzione elettrochimica (Electrochemical Reduction of Carbon dioxide - ERC) [1] (Fig. 1a). Tuttavia, questo approccio presenta delle limitazioni dovute principalmente ad una scarsa selettività, a causa della competizione con l'evoluzione elettrochimica dell'idrogeno dall'acqua, ed alla scarsa efficienza energetica, che si attesta tra il 40 e il 60%, causata anche dalla suscettibilità alle impurità presenti nelle fonti di CO₂ (come SO_x, NO_x e O₂) [4].

Un'alternativa valutata negli ultimi anni è quella di usare enzimi che presentano vantaggi riguardo la selettività e le condizioni blande di reazione, e fanno di essi, sulla carta, delle valide alternative [4]. Tuttavia, sono numerose le sfide che occorre superare per rendere l'utilizzo degli enzimi applicabi-

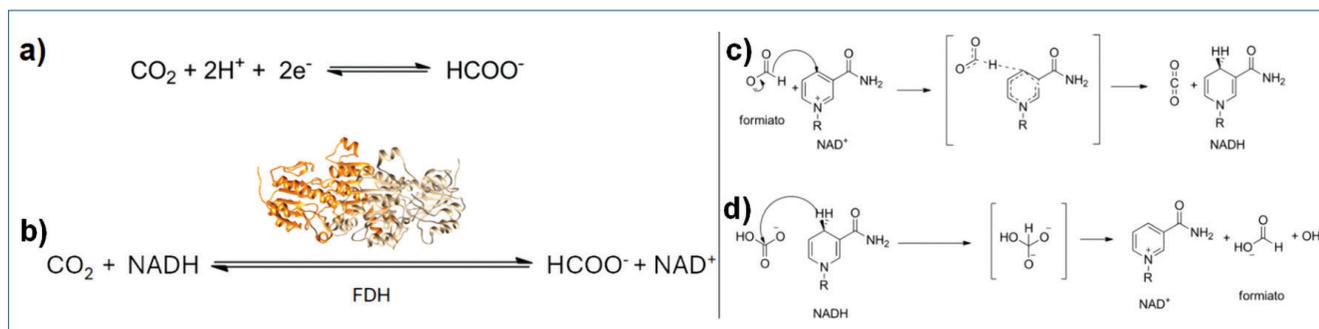


Fig. 1 - a) Reazioni riduzione CO₂; b) riduzione ad opera di FDH; c) meccanismo ossidazione CO₂; d) meccanismo riduzione bicarbonato a formiato

le in contesti industriali: stabilità, sintesi su ampia scala e rigenerazione del cofattore utilizzato dagli enzimi in quantità stechiometrica.

Tra gli enzimi che possono essere utilizzati per la riduzione di anidride carbonica a formiato, le ossido-riduttasi sono la classe di enzimi più studiate. Esse sono in grado di catalizzare il trasferimento di elettroni da un donatore di elettroni ad un accettore di elettroni. Il classico esempio di questa classe di enzimi sono le formiato deidrogenasi (FDH), capaci di trasferire elettroni dal cofattore NAD(P)H alla CO₂ (Fig. 1b).

La famiglia degli enzimi FDH è molto vasta e può essere classificata in due grandi sottogruppi, caratterizzati dalla presenza o meno di metalli [5]. In sintesi, la differenza fondamentale tra le due classi di FDH risiede nella presenza o assenza di metalli nel sito attivo, che determina la necessità di cofattori aggiuntivi, la complessità strutturale, la sensibilità all'ossigeno e il meccanismo catalitico, in particolare nella reazione inversa di riduzione della CO₂. Le FDH metallo-indipendenti, essendo tolleranti all'ossigeno e strutturalmente più semplici, sono considerate più versatili per applicazioni biocatalitiche e per la rigenerazione di NAD(P)H in sistemi che operano in condizioni aerobiche. Le FDH metallo-dipendenti, d'altro canto, benché potenzialmente più attive, richiedono condizioni rigorosamente anaerobiche e fanno parte di sistemi enzimatici più complessi. Oltre al metallo nel sito attivo, possono richiedere la presenza di altri cofattori, a seconda delle subunità enzimatiche coinvolte, come cluster [2Fe-2S] e [4Fe-4S]. Questa necessità di molteplici cofattori rende generalmente la loro produzione proteica più complessa [5].

Il gruppo di FDH metallo-indipendenti è quindi la classe di riduttasi più studiate per questo tipo di applicazione. La loro struttura è generalmente più semplice, essendo spesso omodimeri composti da due domini Rossmann-fold: un dominio catalitico e un dominio che lega il cofattore NAD(P)⁺ [5]. Esempi tipici includono la FDH di *Candida boidinii* (CbFDH).

Le FDH catalizzano una reazione reversibile tra formiato e CO₂ (Fig. 1b). Nella maggior parte dei casi descritti in letteratura, il ruolo principale delle FDH metallo-indipendenti in organismi microbici ospiti e in piante, sembra essere l'ossidazione del

formiato a CO₂ [5, 6]. Questa ossidazione del formiato porta alla riduzione di NAD⁺ a NADH (Fig. 1c). Pertanto, in questo senso, un ruolo naturale è la produzione (o rigenerazione) di NADH come fonte di elettroni. Tuttavia, in molti organismi, la funzione principale di questa ossidazione del formiato, nonostante produca NADH, è considerata principalmente la detossificazione da formiato che si forma durante il metabolismo C1 (ad esempio, da metanolo deidrogenasi e formaldeide deidrogenasi) [5]. Le FDH sono spesso utilizzate in bioprocessi per rigenerare il cofattore NADH. In questi processi, le FDH lavorano spesso in combinazione con altri enzimi che catalizzano la reazione principale. Esempi di enzimi menzionati in questo contesto includono l'alcool deidrogenasi (ad esempio, da *Saccharomyces cerevisiae*) che viene utilizzato per la produzione di alcool cinnamico. Nonostante il ruolo principale descritto per le FDH metallo-indipendenti sia l'ossidazione del formiato con produzione di NADH, le FDH stanno guadagnando sempre più attenzione per la loro capacità di catalizzare la riduzione inversa della CO₂ a formiato [7, 8]. Tra le caratteristiche che le rendono interessanti, oltre alla stabilità all'ossigeno già menzionata, è la buona stabilità termica e la tolleranza a solventi diversi rispetto all'acqua, proprietà che possono essere ulteriormente migliorate tramite ingegneria enzimatica [5]. Per le FDH metallo-indipendenti, questa riduzione della CO₂ a formiato è dipendente dalla presenza di NADH come donatore di elettroni. Il trasferimento di idruro avviene direttamente dal carbonio 4 del nicotinamide alla CO₂ (Fig. 1d). Tuttavia, la riduzione inversa della CO₂ a formiato è meno efficiente rispetto all'ossidazione del formiato, in quanto il potenziale redox di -420 mV è favorevole a quest'ultima reazione. Per favorire la reazione di nostro interesse esistono diverse strategie, principalmente focalizzate sull'enzima stesso, sull'ambiente di reazione e sulla gestione del cofattore [6].

Per quanto riguarda l'enzima la cosa più semplice è quella di selezionare FDH più attive. Il CbFDH è il tipico FDH che può ridurre la CO₂ a formiato con la collaborazione del NADH. L'FDH da *Thiobacillus sp.* KNK65MA (TsFDH), mostra però la più alta attività di riduzione della CO₂ (84,2 volte superiore a quella del CbFDH). Studi strutturali hanno



dimostrato che pur essendo strutturalmente simili, TsFDH presenta loop N- e C-terminali prolungati, che sono probabilmente correlati a una maggiore attività riduttiva della CO_2 [4]. Anche l'ambiente di reazione può però influire sull'efficienza della reazione. Ad esempio, le attività di riduzione della CO_2 di tutte le FDH in condizioni acide sono molto più elevate di quelle in condizioni neutre a causa dell'aumento di 5,8 volte dell'affinità di legame della CO_2 [5, 6].

Attualmente, i dettagli molecolari del meccanismo di riduzione della CO_2 non sono ancora completamente svelati e sono necessari ulteriori studi anche tramite l'utilizzo della AI per sbloccare appieno il potenziale delle FDH in questa direzione. L'ingegneria enzimatica può essere applicata per migliorare la stabilità termica e/o chimica dell'enzima, spostare la preferenza per il cosubstrato, o addirittura modificare radicalmente l'attività catalitica, come dimostrato dalla trasformazione di una FDH in una glicosilato reduttasi tramite specifiche mutazioni che hanno aumentato l'efficienza catalitica per la nuova reazione prevenendo quasi completamente l'ossidazione del formiato [5]. Le simulazioni di dinamica molecolare e gli studi elettrochimici possono fornire informazioni utili che potrebbero guidare la riprogettazione delle FDH per otte-

nere velocità di conversione ancora più elevate. Infine, anche la rigenerazione del cofattore è essenziale per guidare la riduzione della CO_2 . È stato calcolato che la costante di equilibrio della reazione in Fig. 1b è pari a 10^7 . Questo implica che, perché l'equilibrio della reazione sia spostato verso la formazione di formiato, la concentrazione di cofattore NADH debba essere due ordini di grandezza superiore a quella del formiato [6]. Occorre quindi avere un buon metodo di rimozione del prodotto di reazione oltre che un efficiente metodo di rigenerazione del NADH. Metodi elettrochimici diretti per la rigenerazione del NADH sono poco efficienti perché normalmente portano anche alla formazione di isomeri e dimeri del NADH, specie che non sono attive enzimaticamente [9]. Inoltre, richiede un alto *over-potential* che rende il processo poco efficiente dal punto di vista energetico. Sono stati proposti differenti meccanismi per la rigenerazione del NADH che utilizzano come mediatore un complesso di rodio (in particolare il pentametil-ciclopentadienil-2,2'-bipiridina-rodio(III)-idrato $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ o $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$). Questo complesso è tra i catalizzatori non enzimatici più efficaci per la riduzione di NAD(P)^+ a NAD(P)H . $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ può essere ridotto trasformandosi nell'idruro $\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{H}$ che è poi in grado di trasferire l'idruro al cofattore ridotto

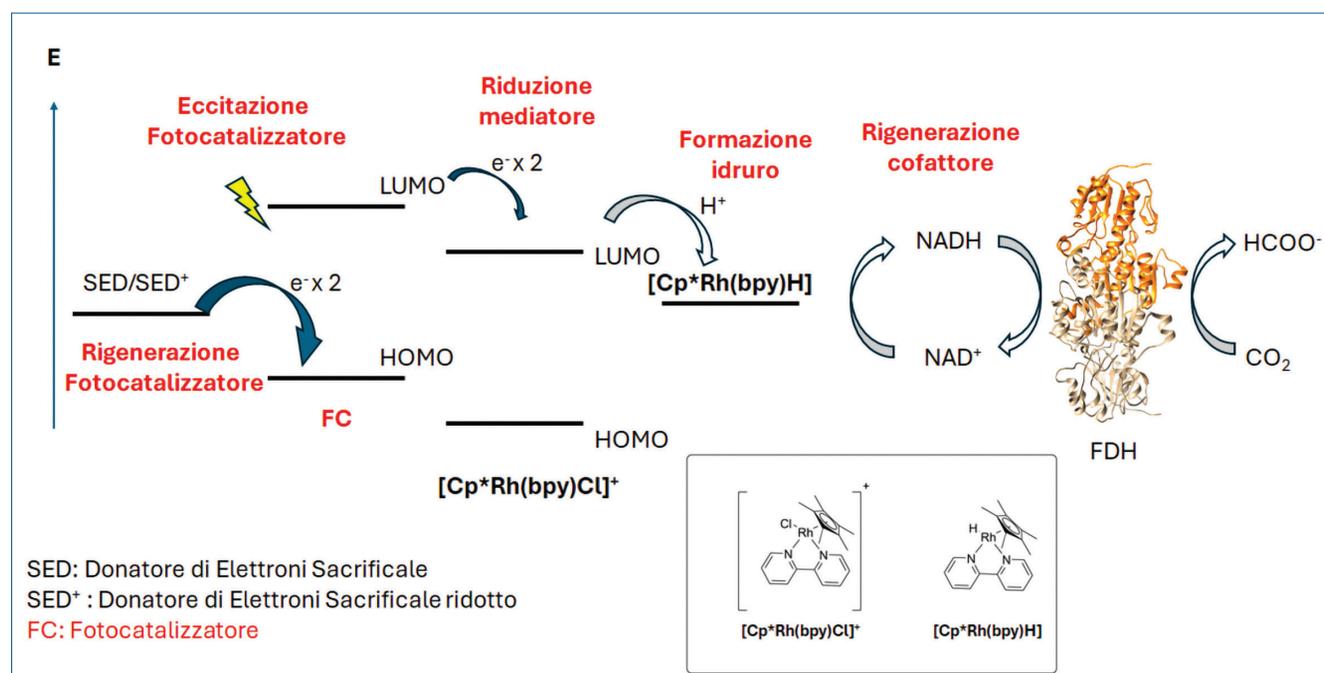


Fig. 2 - Rigenerazione NAD^+ ad opera di un fotocatalizzatore e mediata da $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$

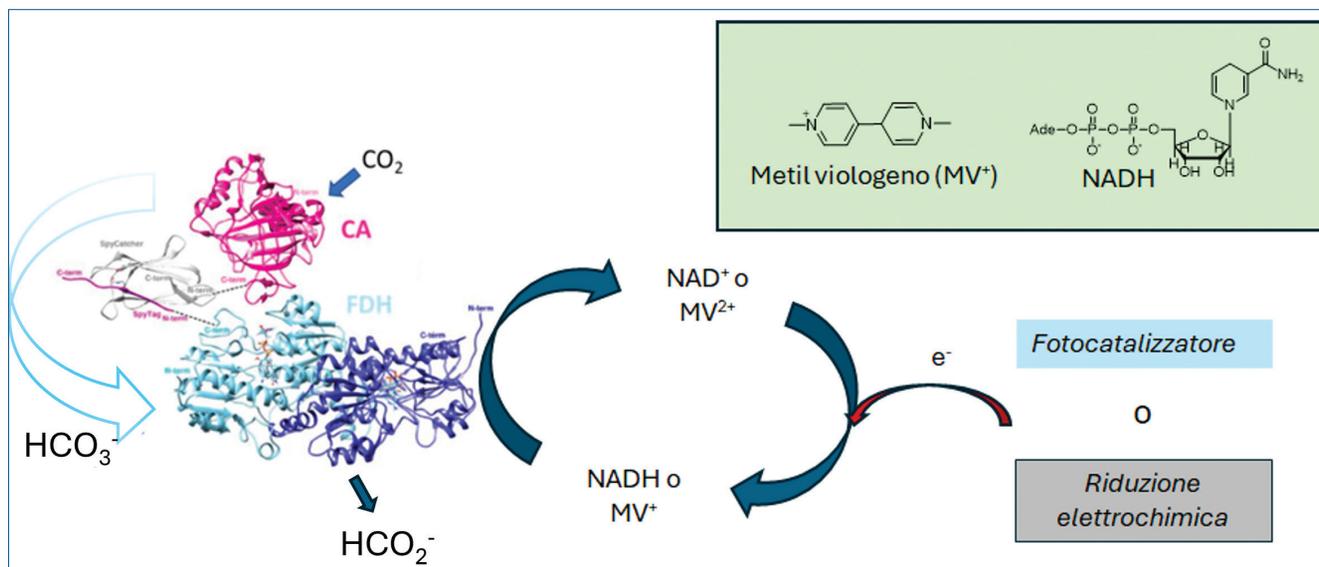


Fig. 3 - Utilizzo di FDH e CA per la cattura e riduzione della CO₂ a formiato

(NAD⁺) [7, 10]. La riduzione del mediatore può essere effettuata attraverso metodi elettrochimici oppure attraverso opportuni fotocatalizzatori. L'utilizzo di fotocatalizzatori è la via auspicabile perché permetterebbe di utilizzare direttamente la radiazione solare per rigenerare NADH e da questo a fuels (formiato). La letteratura riporta vari sistemi sia omogenei che eterogenei: complessi molecolari di rodio e fotosensibilizzatori organici (come Eosina Y e porfirine) come catalizzatori omogenei; complessi di rodio immobilizzati su vari supporti (nanotubi di carbonio, MOF, polimeri, elettrodi di carbonio) e materiali semiconduttori come g-C₃N₄ e TiO₂ sono presentati come catalizzatori eterogenei per la rigenerazione del NADH [11] (Fig. 2). Tuttavia [Cp^{*}Rh(bpy)H₂O]²⁺ disperso in soluzione può interagire con l'enzima, in particolare con gruppi tiolici od amminici, e portare alla disattivazione del catalizzatore stesso [8]. Per questo motivo la strategia che prevede di ancorare il catalizzatore ed in parte segregarlo dalla proteina, magari immobilizzando anche l'enzima, sembra essere la via più promettente [9].

Un'altra strada che è stata percorsa è quella di utilizzare cofattori alternativi all'NADH, con lo scopo sia di eliminare il mediatore di Rh (con tutte le problematiche connesse) sia di spostare l'equilibrio della reazione verso la formazione del formiato. Recentemente è stato esplorato l'uso di cofattori artificiali, come il radicale cationico del metilviologeno (MV⁺) [6]. Questa specie radicalica può es-

sere facilmente generata sia elettrochimicamente che per fotocatalisi. Può essere utilizzato dalla FDH metallo-indipendenti, in particolare da CbFDH, per catalizzare la riduzione della CO₂ a formiato. Una delle caratteristiche più interessanti è che MV⁺ agisce come cofattore "unidirezionale", essendo utilizzato efficacemente dall'FDH per la riduzione della CO₂ ma non per la reazione inversa di ossidazione, il che contribuisce a rese elevate. Questo è dovuto ad un potenziale di ossidoriduzione della coppia MV²⁺/MV⁺ di 0,120 V più negativo rispetto alla coppia NAD⁺/NADH.

Sulla base di queste prerogative, e grazie all'iniziativa europea Clean Energy Transition Partnership (CETP) che mira a promuovere e accelerare la transizione verso un sistema energetico pulito e sostenibile mettendo in comune i programmi di ricerca e innovazione nazionali, è nato il progetto BIOCUF (Biomimetic CO₂ Fixation and Utilization for Formate Production) con l'obiettivo generale di sviluppare un prototipo per la cattura di CO₂ e la sua simultanea trasformazione in formiato. Questo verrà realizzato utilizzando una combinazione di due enzimi, l'anidrasi carbonica (CA) e la FDH, all'interno di un solvente a cambio di fase. Gli obiettivi specifici del progetto includono la generazione di varianti migliorate di CA e FDH tramite l'identificazione dei migliori enzimi naturali e l'ingegneria proteica per migliorare la cattura e l'utilizzo della CO₂. Un punto chiave è la progettazione di



un complesso CA-FDH in cui la CA catalizza la reazione della CO₂ gassosa in ione bicarbonato che la FDH utilizzerà come substrato per produrre ione formiato. Il metodo SpyTag/SpyCatcher [12] verrà utilizzato per collegare in modo stabile e orientato i due enzimi, potenziando l'efficienza del processo biochimico (Fig. 3). Il progetto prevede di dimostrare e valutare l'uso del complesso CA-FDH e delle sue formulazioni con un solvente a cambio di fase in un impianto pilota di cattura della CO₂. Come già descritto, la rigenerazione del cofattore richiesto dalla FDH è un aspetto critico. Verranno esplorati sia metodi di rigenerazione elettrochimica del metil viologeno sia la rigenerazione fotocatalizzata di NADH e metil viologeno, attraverso opportuni fotocatalizzatori eterogenei.

Il consorzio BIOCUF è multi-disciplinare e comprende biologi, biochimici, scienziati dei materiali, ingegneri chimici e di processo. Lo sviluppo di nuovi efficaci enzimi prevede il coinvolgimento di diversi gruppi di ricerca. Per quanto riguarda lo studio l'ingegnerizzazione, produzione e test di attività degli enzimi saranno coinvolti il Gebze Technical University (GTU/GERC-Turchia), coordinatore del progetto, Kafkas University (KAFKAS - Turchia), CNR-SCITEC, Agricultural University of Athens (AUA-Grecia) e University of Eastern Finland (TUNI-UEF, Finlandia). Completano il partenariato il Centre for Research and Technology Hellas (CERTH - Grecia) che ospiterà l'impianto pilota ed è specializzato nella progettazione di sistemi di cattura e utilizzo della CO₂ e nell'ingegneria di impianti pilota; Cicci Research Srl (Italia), startup privata con esperienza in piattaforme di test optoelettronici, responsabile dello sviluppo dell'apparato elettrochimico per la rigenerazione del cofattore e dei sensori per l'analisi in linea; CNR-ICCOM con esperienza nella sintesi organica, catalisi/fotocatalisi e conversione di energia solare, coinvol-

to nello sviluppo di sistemi per la rigenerazione del cofattore con metodi elettrochimici/fotocatalitici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.P. Jones, G. Prakash *et al.*, *Isr. J. Chem.*, 2014, **54**, 1451.
- [2] R. Nie, Y. Tao *et al.*, *ACS Catal.*, 2021, **11**, 1071.
- [3] N.V. Rees, R.G. Compton, *J. Solid. State. Electr.*, 2011, **15**(10), 2095.
- [4] H. Chen, Y. Huang *et al.*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2023, **178**, 113271.
- [5] A. Maier, L.M. Mguni *et al.*, *ChemCatChem*, 2024, **16**, e202401021.
- [6] B.S. Jayathilake, S. Bhattacharya *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, 2019, **52**(3), 676.
- [7] B. Tan, D.P. Hickey *et al.*, *Electrochem. Soc.*, 2015, **162**(3), H102.
- [8] S. Maity, Y. Park *et al.*, *CS Appl. Energy Mater.*, 2025, **8**, 2498.
- [9] L. Zhang, N. Vilà *et al.*, *ACS Catal.*, 2017, **7**, 4386.
- [10] S.H. Lee, D.H. Nam *et al.*, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 1621.
- [11] Y. Zhang, Y. Zhao *et al.*, *Sol. RRL*, 2021, **10**, 1621.
- [12] A.H. Keeble, M. Howarth, *Chemical Science*, 2020, **11**(28), 7281.

Formate: a Sustainable Future from CO₂

The conversion of CO₂ into formate using enzymes such as formate dehydrogenases (FDH) represents a promising strategy to reduce emissions and valorize CO₂. However, to make the process sustainable, further efforts are needed to optimize both the conversion efficiency and the regeneration of the cofactor (NADH or methyl viologen).