

Ein Redoxhydrogel schützt die O₂-empfindliche [FeFe]-Hydrogenase aus *Chlamydomonas reinhardtii* vor oxidativer Zerstörung**

Alaa Alsheikh Oughli, Felipe Conzuelo, Martin Winkler, Thomas Happe, Wolfgang Lubitz, Wolfgang Schuhmann, Olaf Rüdiger* und Nicolas Plumeré*

Abstract: Die Integration empfindlicher Katalysatoren in Redoxpolymere ist eine Möglichkeit, diese vor desaktivierenden Molekülen wie O₂ zu schützen. [FeFe]-Hydrogenasen sind Enzyme, die die Oxidation sowie Produktion von H₂ katalysieren. Da sie aber durch O₂ irreversibel desaktiviert werden, war die Verwendung dieser Enzyme unter aeroben Bedingungen bisher unmöglich. Die Integration solcher Hydrogenasen in mit Viologenderivaten modifizierten Hydrogelfilmen ermöglicht auch in Gegenwart von O₂ katalytische Ströme für die H₂-Oxidation und demonstriert damit einen Schutzmechanismus unabhängig von Reaktivierungsprozessen. Im Hydrogel werden die Elektronen aus der durch die Hydrogenase katalysierten H₂-Oxidation zur Hydrogel-Elektrolyt-Grenzfläche transportiert, um dort die schädlichen O₂-Moleküle abzufangen, bevor sie die Hydrogenase desaktivieren können. Wir illustrieren mögliche Anwendungen dieses Schutzmechanismus für eine Biobrennstoffzelle bei gemischter H₂/O₂-Zufuhr.

Der Ausblick, Edelmetalle mit Elementen wie Co, Ni oder Fe als Katalysatoren für die H₂-Oxidation^[1] und H₂-Entwicklung^[2] zu ersetzen, eröffnet neue Perspektiven für kosteneffiziente Anoden in Brennstoffzellen und Kathoden in Elektrolyseuren. Die aktivsten Fe/Ni-basierten Katalysatoren für die H₂-Oxidation und H₂-Entwicklung leiden allerdings unter der Desaktivierung durch O₂,^[3] die selbst durch Spuren von O₂ verursacht wird. Daher basieren mögliche technologische Anwendungen auf der Zufuhr von hochreinem H₂ und strikt anaeroben Bedingungen.

Hydrogenasen gehören zu den aktivsten Katalysatoren für die H₂/H⁺-Umwandlung.^[4] Die Suche nach O₂-toleranten Hydrogenasen und die Aufklärung von Desaktivierungs- und

Schutzmechanismen^[5] sind vielversprechende Forschungsstrategien für das Design robuster Enzyme^[3b, 6] und biomimetisch inspirierter synthetischer Katalysatoren.^[3a] Allerdings wird generell die katalytische Leistung, sowohl in Bezug auf die katalytische Produktivität als auch auf die Überspannung, mit erhöhter O₂-Toleranz geringer.^[4b, 7]

Wir haben kürzlich eine alternative Strategie vorgeschlagen, um ohne Änderung der intrinsischen O₂-Empfindlichkeit die technische Anwendung hochaktiver Katalysatoren zu ermöglichen.^[8] Wir integrierten eine [NiFe]-Hydrogenase als H₂-Oxidationskatalysator in mit Viologenen modifizierten Redoxhydrogelen. Daraus resultierten bei geringer Überspannung hohe Stromdichten für die H₂-Oxidation, sogar in Anwesenheit von O₂ (5% Partialdruck im H₂-Zustrom). Der vorgeschlagene Schutzmechanismus basiert auf der durch Hydrogenase katalysierten H₂-Oxidation innerhalb des Films, welche die Elektronen für die Viologen-katalysierte O₂-Reduktion an der äußeren Schicht des Films an der Hydrogel-Elektrolyt-Grenzfläche bereitstellt (Modell A, Abbildung 1 A). Der Inhibitor O₂ wird reduziert, bevor er die Schicht der aktiven Hydrogenase erreicht.

Andere Konzepte, die auf Viologen-haltigen Dünnschichten,^[11] Chinon-haltigen Membranen^[12] und porösen Elektroden^[1e] basieren, wurden genutzt, um die O₂-Toleranz verschiedener O₂-empfindlicher [NiFe]-Hydrogenasen zu verbessern. Dennoch wurde der O₂-Schutz auf die Reaktivierung der Hydrogenasen durch die Reduktionskraft des Viologen-Radikalkations (Modell B, Abbildung 1B) oder auf die eingeschränkte O₂-Diffusion in die poröse Elektrodenmatrix zurückgeführt.^[1e] Der erste Mechanismus trägt auch zum Schutz der reversibel gehemmten [NiFe]-Hydrogenase bei, die im Viologen-modifizierten Redoxhydrogelfilm integriert

[*] A. A. Oughli, Prof. W. Lubitz, Dr. O. Rüdiger
Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
E-Mail: olaf.ruediger@cec.mpg.de
Dr. F. Conzuelo, Prof. W. Schuhmann
Analytische Chemie – Zentrum für Elektrochemie
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)
Dr. M. Winkler, Prof. T. Happe
Lehrstuhl Biochemie der Pflanzen, AG Photobiotechnologie
Ruhr Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44801 Bochum (Deutschland)
Dr. N. Plumeré
Zentrum für Elektrochemie – Molecular Nanostructures
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)
E-Mail: nicolas.plumere@rub.de

[**] Wir bedanken uns bei David Adam, Stefanie Stapf, Inge Heise und Birgit Nöring für die technische Hilfe, der Deutsch-Israelischen Projektkooperation im Rahmen des Projektes „Nanoengineered optoelectronics with biomaterials and bioinspired assemblies“ und dem Cluster of Excellence RESOLV (EXC1069), gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), für die finanzielle Unterstützung. A.A.O., W.L. und O.R. danken für die Förderung durch die Max-Planck-Gesellschaft und T.H. für die Unterstützung durch die DFG (HA 255/2-1), die Volkswagen Stiftung (LigH2t) und das BMBF (Sun2Chem).

█ Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zu Polymer-synthese, Elektrodenpräparation und elektrochemischen Messungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502776> zu finden.

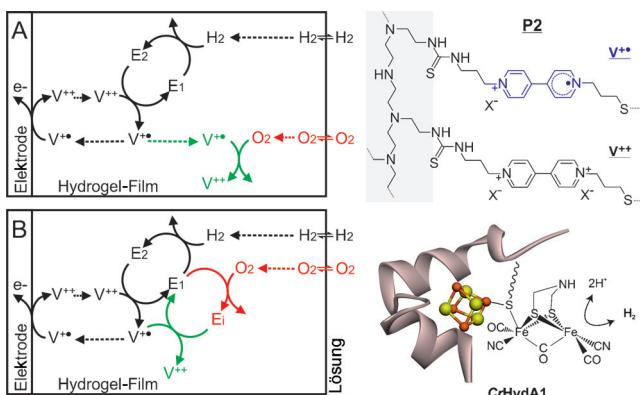


Abbildung 1. Links: vorgeschlagene Modelle für den O_2 -Schutzmechanismus im Redoxhydrogelfilm. A) O_2 wird in einer dünnen Schicht nahe der Hydrogel-Elektrolyt-Grenzfläche reduziert, um die O_2 -induzierte Desaktivierung der Hydrogenase in der inneren Schicht des Films zu verhindern.^[8] B) O_2 desaktiviert das Enzym innerhalb des Films und dieses wird am Redoxhydrogel reaktiviert, wobei die relativen Anteile der Reaktion (durchgehende Pfeile) und der Diffusionsprozesse (gestrichelte Pfeile) die katalytische Gesamtleistung definieren.^[9] Inhibitor und Wege der Desaktivierung sind in rot dargestellt, Reaktivierung/Schutzmechanismen in Grün. Rechts oben: das Viologen-modifizierte Polymer (P2) mit der reduzierten Viologengruppe in Blau. Rechts unten: das aktive Zentrum der CrHydA1 (PDB-Nummer: 3LX4).^[10]

ist. Der Reaktivierungsmechanismus würde allerdings voraussetzen, dass nur reversibel gehemmte Katalysatoren geschützt werden können. Der zweite Mechanismus, der auf die eingeschränkte O_2 -Diffusion basiert, würde die Inaktivierung verzögern aber nicht vermeiden, wie für poröse Graphitmaterialien gezeigt wurde.^[1e] Daher ist unter Berücksichtigung dieser möglichen Schutzmechanismen eine große Zahl irreversibel gehemmter Katalysatoren, beispielsweise die [FeFe]-Hydrogenasen^[13] und die meisten synthetischen Katalysatoren,^[14] einer möglichen technologischen Anwendung nicht zugänglich.

Simulationen auf der Basis von kinetischen und Masse-transport-Parametern, die für die Analyse chemischer Reaktionen und der zugehörigen zeitabhängigen Konzentrationsprofile innerhalb des Redoxhydrogels, die [NiFe]-Hydrogenase enthalten, angewendet wurden, legen nahe, dass die Reaktivierung nicht zum Schutz des Katalysators erforderlich ist.^[9]

Hier wurde das Konzept des Hydrogelschutzes auf die besonders O_2 -empfindliche [FeFe]-Hydrogenase aus *Chlamydomonas reinhardtii* (CrHydA1) angewendet. Im Unterschied zu [NiFe]-Hydrogenasen wird das aktive Zentrum der [FeFe]-Hydrogenasen durch O_2 irreversibel geschädigt.^[5b, 15] Wenn das Modell zur O_2 -Reduktion, das wir in unserer früheren Arbeit vorgeschlagen hatten (Abbildung 1 A), stimmt, sollte das Redoxhydrogel auch die [FeFe]-Hydrogenase CrHydA1 vor Desaktivierung durch Sauerstoff schützen.

Das Redoxpolymer (P1), welches zuvor für die [NiFe]-Hydrogenase genutzt wurde, war so konzipiert, dass es 1) die Bildung stabiler Hydrogelfilme, 2) die Erzeugung hoher katalytischer Stromdichten für die H_2 -Oxidation und 3) den

Schutz vor oxidativen Schäden gewährleisten kann.^[8] Die Viologengruppen wurden ausgewählt, um für den Elektronentransfer und für die Schutzprozesse im Polymer zu sorgen, während das Polyethyleniminkrückgrat elektrostatische Wechselwirkungen mit der partiell negativ geladenen [NiFe]-Hydrogenase ermöglichte und diese an das Hydrogel band. Für die Integration der [FeFe]-Hydrogenase musste die Polymerstruktur angepasst werden, um es an die spezifischen Eigenschaften des Proteins wie beispielsweise Ladungsverteilung und Größe anzupassen (siehe die Hintergrundinformationen). Die Viologengruppen blieben unverändert, um zu gewährleisten, dass die Redoxpufferung und die sauerstoffreduzierenden Eigenschaften des resultierenden Polymers (P2, Abbildung 1) äquivalent zu den Eigenschaften von P1 sind, die für die [NiFe]-Hydrogenase verwendet wurde.

Die Viologengruppen von P2 haben ein Redoxpotential von $E_{V++/V+} = -260$ mV (gegen Standard-Wasserstoffelektrode, SHE), das nahezu mit dem von P1^[8] identisch ist (Abbildung 2 A, blau). Bei Zugabe von H_2 resultiert für den Polymerfilm (P2) auf der Glaskohlenstoffelektrode kein katalytischer Strom (Abbildung 2 A und B, blau). Wenn P2 zusammen mit CrHydA1 auf der Elektrode immobilisiert wird, zeigt das entstandene Redoxhydrogel bei Zugabe von H_2 einen katalytischen Oxidationsstrom mit einem Startpotential, welches dem der Viologengruppe im Hydrogel entspricht (Abbildung 2 A). Dies beweist, dass die Viologengruppen den Elektronentransfer vom Enzym zur Elektrode bewirken. Die katalytischen Ströme sind mit Stromdichten von (444 ± 55) $\mu A \text{ cm}^{-2}$ (fünf individuell präparierte Elektroden) stabil (Abbildung S2). Obwohl der Redoxhydrogelfilm auf einer flachen Elektrode abgeschieden ist, sind die gemessenen Stromdichten vergleichbar mit jenen nanostrukturierter Elektroden, die mit einem Viologenpolymer und einer [NiFe]-Hydrogenase modifiziert wurden.^[16] Die signifikante Triebkraft, die durch das Redoxpotential der Viologengruppe bestimmt wird, begünstigt einen schnellen Elektronentransfer von der Hydrogenase zum Viologen. Der umgekehrte Prozess hingegen ist behindert. Daher wird für die in P2 eingebettete [FeFe]-Hydrogenase kein katalytischer Strom für die H_2 -Entwicklung beobachtet (Abbildung 2 A).

Es wurde beschrieben, dass [FeFe]-Hydrogenasen in Anwesenheit von H_2 bei hohen Potentialen sowohl reversibel als auch irreversibel inaktivieren.^[17] Dieser Prozess ist, wenn das Enzym auf einer Graphitelektrode adsorbiert ist (direkter ET), durch den Abfall des katalytischen H_2 -Oxidationsstroms bei Potentialen über -100 mV gegen SHE deutlich sichtbar (Abbildung 2 A und B, rot). Alle Hydrogenasen leiden an der Desaktivierung durch hohe Potentiale, unabhängig davon, ob planare oder hochporöse Elektroden verwendet werden. Deshalb sind die Anwendungen limitiert. Die Desaktivierung durch hohe Potentiale wird bei der Elektrode mit der Hydrogenase im Viologen-modifizierten Hydrogel nicht beobachtet. Unter den Bedingungen eines auf Redoxmediatoren basierenden Elektronentransfers erfahren die Enzyme nur das Formalpotential des Viologenredoxpaars unabhängig von dem angelegten Potential an der Elektrode. Da $E_{V++/V+}$ niedriger ist als das Inaktivierungspotential der Hydrogenase, können die oxidierten Viologengruppen im Redoxpolymer die Inaktivierung der Hydrogenase nicht verursachen. Der

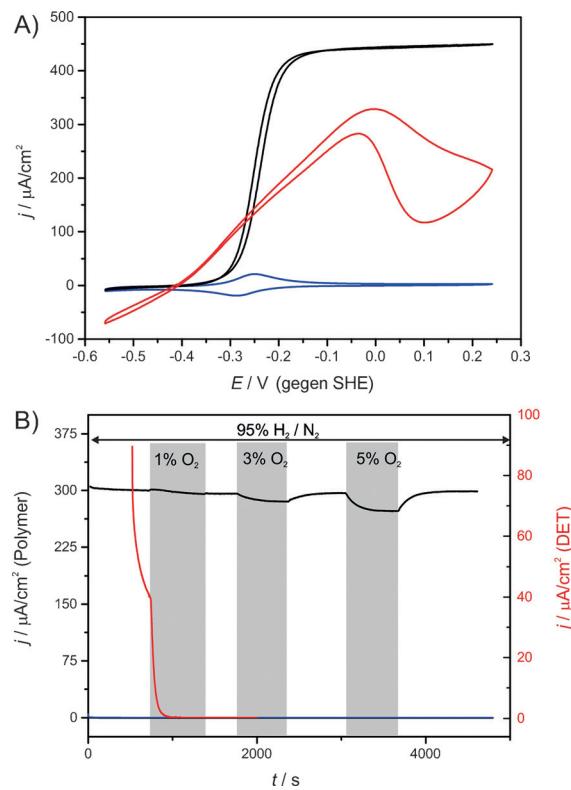


Abbildung 2. A) Vergleich der Zyklovoltammogramme (CV) des Polymerfilms (P2) ohne Hydrogenase auf der Elektrode (blau), mit CrHydA1 [FeFe]-Hydrogenase/Polymer auf der Elektrode (schwarz) und eine kovalent modifizierte Graphitelektrode mit der adsorbierten Hydrogenase in einer Konfiguration, die direkten Elektronentransfer (DET) ermöglicht (rot). Experimentelle Bedingungen: Elektrodenrotationsrate 2000 rpm; pH 7.0; 25 °C; 20 mVs⁻¹ und 1 bar H₂ (schwarz und rot) und 20 mVs⁻¹ und 1 bar H₂ (blau). B) Chronoamperometrie (CA) zur Auswertung der Sauerstofftoleranz. Schwarz: Glaskontaktelektrode (GCE) beschichtet mit Polymer P2, rot: Graphitelektrode mit dem gleichen Enzym bei Bedingungen für direkten Elektronentransfer. Der katalytische Strom nimmt vor O₂-Zufuhr aufgrund der schnellen Inaktivierung beim angelegten Potential ab. Während der O₂-Zufuhr wurde die Konzentration an H₂ konstant auf 95% gehalten, und N₂ wurde als inertes Gas verwendet. CA aufgenommen bei +141 mV gegen SHE; pH 7.0; 25 °C; 2000 rpm und einem Gasstrom von 2000 sccm.

Schutz gegenüber der Inaktivierung bei hohem Potential ist analog zu P1 und der [NiFe]-Hydrogenase gezeigt worden.

Die größte Herausforderung war der Schutz der [FeFe]-Hydrogenase gegen die O₂-Inaktivierung. Wenn die [FeFe]-Hydrogenase an der Elektrode adsorbiert ist, sodass ein direkter Elektronentransfer möglich ist (Abbildung 2B, rot), fällt der katalytische Strom schnell ab und wird auch bei erneuter H₂-Zufuhr (100%) nicht wieder erreicht. Ist das Enzym allerdings in der Redoxhydrogelmatrix eingebettet, kann die Aktivität bei der H₂-Oxidation aufrechterhalten werden, sogar mit 5% O₂ in der H₂-Gaszufuhr und zwar für bis zu 5 min (Abbildung 2B, schwarz). Bei einer gemischten H₂/O₂-Atmosphäre ist der kathodische Strom für die O₂-Reduktion, der bei starker negativen Potentialen als $E_{V++/V+}$ zu erwarten ist, kaum erkennbar, was zeigt, dass H₂ als Reduktionsmittel dient (Abbildung S4). Wenn statt der O₂/H₂-At-

mosphäre wieder 100% H₂ verwendet wird, erreicht der katalytische Strom der H₂-Oxidation wieder den Ausgangswert. Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Beleg für das Modell A (Abbildung 1), welches den Schutz vor O₂ innerhalb des Polymerfilms als Folge der Reduktion von O₂ an der Außenschicht des Polymerfilms beschreibt. In Abwesenheit von O₂ wird H₂ von der Hydrogenase oxidiert, wobei Elektronen zu nahegelegenen oxidierten Viologengruppen transportiert werden. Über die am Polymer gebundenen Viologene findet der Elektronentransfer zur Elektrodenoberfläche statt, wobei das Viologen reoxidiert wird. Wenn O₂ im Gasgemisch vorhanden ist, wird es an der Oberfläche des Hydrogelfilms durch die Viologen-Radikalkationen reduziert, sodass das Innere des Hydrogelfilms anaerob bleibt. Der beobachtete Abfall des katalytischen Stroms in Gegenwart von O₂ resultiert also aus dem Verbrauch der an der durch die Hydrogenasereaktion erzeugten Viologen-Radikalkationen zur Reduktion von O₂ an der Hydrogelfilmoberfläche anstatt ihrer Reoxidation an der Elektrodenoberfläche. Somit wird ein Teil der aus der Oxidation von H₂ auf den Redoxpolymerfilm übertragenen Elektroden für die Reduktion von O₂ geopfert. Die Verminderung des katalytischen Stroms zur Entfernung von O₂ liefert einen deutlichen Beweis für den postulierten Schutzmechanismus. Im Fall der [NiFe]-Hydrogenase könnte jedoch angenommen werden, dass sich der Stromabfall in Gegenwart von O₂ auf die Desaktivierung und nachfolgende Reaktivierung des Enzyms bezieht (Modell B, Abbildung 1).^[11] Dies ist jedoch für die [FeFe]-Hydrogenase unmöglich, da die Inaktivierung sogar in Anwesenheit sehr geringer O₂-Konzentrationen vollständig irreversibel ist, sodass auch keine Regeneration nach Rückkehr zu reinem H₂ zu erwarten war, was auch durch die Messung im direkten Elektronentransfer belegt wird. Daher beruht der Schutzmechanismus auf Elektronen-„Hopping“ im Redoxpolymerfilm zur Hydrogeloberfläche und der dort erfolgenden Reduktion von O₂ (Modell A) und ist keine Folge einer Enzymreaktivierung (Modell B).

Alternative Konzepte unter Nutzung von porösen Kohlenstoffmaterialien, welche die O₂-Diffusion einschränken, wurden zuvor als Schutz für [NiFe]-Hydrogenasen vorgeschlagen.^[1c] Allerdings ist nicht zu erwarten, dass die Verringerung der O₂-Diffusion einen ähnlichen Schutz erreichen kann, wie er durch den Redoxhydrogelfilm erzielt wird, insbesondere da die Diffusion kleiner Moleküle in einer hochsolvatisierten Polymermatrix nicht signifikant verringert werden kann.^[19] Folglich wurde die Verwendung poröser Kohlenstoffmaterialien zum Schutz für [FeFe]-Hydrogenase noch nicht demonstriert.

Obwohl die [FeFe]-Hydrogenase zu den aktivsten Hydrogenasen gehört,^[22] wurde sie aufgrund ihrer extremen O₂-Empfindlichkeit noch nicht in einer Brennstoffzelle genutzt. Da unsere Experimente nahelegen, dass die Hydrogenase aus CrHydA1 integriert in ein Redoxhydrogelfilm die H₂-Oxidation in Gegenwart von O₂ ohne signifikanten Aktivitätsverlust und ohne Desaktivierung durch hohe Potentiale aushalten kann, testeten wir die Elektrode in einer Brennstoffzelle mit ungeteiltem Anoden- und Kathodenraum bei durch die Anodenreaktion limitierten Bedingungen. Dabei ist das Enzym den härtesten Bedingungen, die in einer Brennstoffzelle

möglich sind, ausgesetzt, nämlich der Gegenwart von O_2 und hohen Potentialen. Diese Bedingungen führen zu geringen Leistungen der Brennstoffzelle mit der Hydrogenase in einer direkten Elektronentransferkonfiguration, sogar wenn O_2 -tolerante Hydrogenasen eingesetzt werden.^[18,21] Um die Limitierung durch die Anodenreaktion, also die Oxidation von H_2 , sicherzustellen, nutzten wir eine überdimensionierte O_2 -reduzierende Kathode. Die Kathode basierte auf Bilirubin-Oxidase (BOD), die kovalent auf der Oberfläche eines Kohlefaservlieses immobilisiert wurde.^[22] Messungen der zwei Halbzellen unter Gaszufuhr von 95 % H_2 /5 % O_2 zeigen, dass die Brennstoffzelle durch den Strom der Hydrogenase-Redoxhydrogel-Elektrode limitiert ist (Abbildung S3). Die Brennstoffzelle wurde bei ansteigender Last zwischen Anode und Kathode getestet (Abbildung 3). Es wurden eine Leer-

spannung von bis zu 5 % O_2 in H_2 . Dies ist weit mehr als die O_2 -Verunreinigungen in Gasmischungen, die üblicherweise in technischen Anwendungen zu finden sind. Es werden so neue Möglichkeiten eröffnet, um äußerst aktive aber hoch O_2 -empfindliche und irreversibel deaktivierbare Katalysatoren in Brennstoffzellen und in photokatalytischen H_2 -entwickelnden Systemen zu verwenden.^[27] Künftige Entwicklungen des Redoxhydrogels werden den Schwerpunkt auf eine Erhöhung der Kinetik für die O_2 -Reduktion zu Wasser legen,^[8,28] um so den langsamen Verlust an Viologen durch die nur teilweise reduzierten Reaktionsintermediate wie das Superoxidradikal oder Wasserstoffperoxid^[29] zu verhindern.

Stichwörter: Biobrennstoffzelle · Biokatalyse · Hydrogenase · O_2 -Schutz · Viologen-Hydrogel

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12329–12333
Angew. Chem. **2015**, *127*, 12506–12510

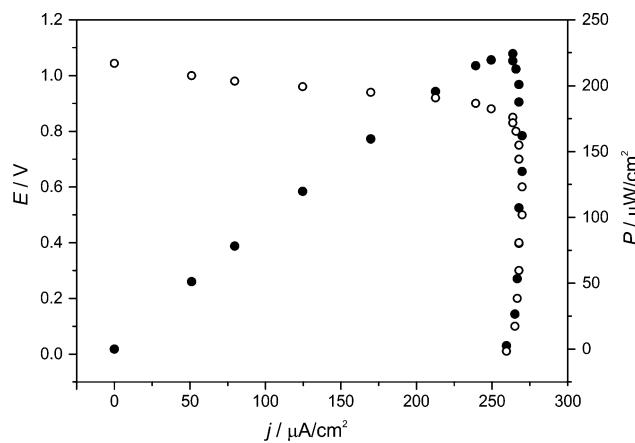


Abbildung 3. Auftragung von Zellspannung (E , leerer Kreise) und Leistungsdichte (P , ausgefüllter Kreis) gegen die Stromdichte einer Brennstoffzelle mit nicht geteilter Anoden- und Kathodenraum unter gemischter H_2/O_2 -Zufuhr mit einer Redoxhydrogel/CrHydA1-[FeFe]-Hydrogenase-Anode und einer Bilirubin-Oxidase(BOD)-Kathode.

laufspannung von 1080 mV, ein Kurzschluss-Strom von $280 \mu\text{A cm}^{-2}$ und eine maximale Leistungsdichte von $225 \mu\text{W cm}^{-2}$ ermittelt (bezogen auf die Fläche der Anode).

Erhebliche Anstrengungen wurden gemacht, um den O_2 -Inaktivierungsmechanismus dieser Klasse von Hydrogenasen zu verstehen,^[5b,15,23] wobei die bisherige Hauptstrategie zur Verbesserung der O_2 -Toleranz entweder auf dem Design spezifischer Proteinmutanten^[24] oder auf der Entstehung und Untersuchung großer zufälliger Mutagenesebibliotheken beruhte.^[25] Allerdings zeigten beide Strategien bisher nur begrenzten Erfolg. Diese Ergebnisse zeigen den erheblichen Vorteil der von uns vorgeschlagenen chemischen Methode, Viologen-modifizierte Hydrogеле zu nutzen, um die äußerst O_2 -empfindliche Hydrogenase so effektiv zu schützen, dass die Verwendung in Brennstoffzellen mit gemischter H_2/O_2 -Gaszufuhr möglich wird. Die Leistung der Brennstoffzelle war vergleichbar mit der bisher berichteten nicht nanostrukturierter Brennstoffzellen auf der Basis O_2 -toleranter Hydrogenasen.^[26] Außerdem bestätigen die Ergebnisse das Modell, da auch eine Hydrogenase, die durch O_2 irreversibel inaktiviert wird, innerhalb des Viologenhydrogels vor O_2 geschützt werden kann. Das Enzym bleibt aktiv in Gegenwart

- [1] a) A. de Pouliquet, D. Ranava, K. Monsalve, M.-T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 1724–1750; b) A. A. Karyakin, S. V. Morozov, O. G. Voronin, N. A. Zorin, E. E. Karyakina, V. N. Fateyev, S. Cosnier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7244–7246; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7382–7384; c) A. Le Goff, V. Artero, B. Joussetme, P. D. Tran, N. Guillet, R. Metaye, A. Fihri, S. Palacin, M. Fontecave, *Science* **2009**, *326*, 1384–1387; d) P. D. Tran, A. Le Goff, J. Heidkamp, B. Joussetme, N. Guillet, S. Palacin, H. Dau, M. Fontecave, V. Artero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1371–1374; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1407–1410; e) L. Xu, F. A. Armstrong, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 3649–3656.
- [2] a) V. Artero, M. Chavarot-Kerlidou, M. Fontecave, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7238–7266; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7376–7405; b) M. L. Helm, M. P. Stewart, R. M. Bullock, M. Rakowski DuBois, D. L. DuBois, *Science* **2011**, *333*, 863–866; c) W. M. Singh, T. Baine, S. Kudo, S. Tian, X. A. Ma, H. Zhou, N. J. DeYonker, T. C. Pham, J. C. Bollinger, D. L. Baker, B. Yan, C. E. Webster, X. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5941–5944; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6043–6046; d) P. Zhang, M. Wang, Y. Yang, D. Zheng, K. Han, L. Sun, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14153–14156.
- [3] a) F. Lakadamali, M. Kato, N. M. Muresan, E. Reisner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9381–9384; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9515–9518; b) J. G. Kleingardner, B. Kandemir, K. L. Bren, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4–7; c) S. Dey, A. Rana, D. Crouthers, B. Mondal, P. K. Das, M. Y. Darensbourg, A. Dey, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8847–8850.
- [4] a) A. K. Jones, E. Sillery, S. P. J. Albracht, F. A. Armstrong, *Chem. Commun.* **2002**, 866–867; b) W. Lubitz, H. Ogata, O. Ruediger, E. Reijerse, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4081–4148.
- [5] a) K. Grubel, P. L. Holland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3308–3310; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3364–3366; b) K. D. Swanson, M. W. Ratzloff, D. W. Mulder, J. H. Artz, S. Ghose, A. Hoffman, S. White, O. A. Zadvornyy, J. B. Broderick, B. Bothner, P. W. King, J. W. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1809–1816.
- [6] a) A. Abou Hamdan, P.-P. Liebgott, V. Fourmond, O. Gutiérrez-Sanz, A. L. de Lacey, P. Infossi, M. Rousset, S. Dementin, C. Léger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19916–19921; b) P.-P. Liebgott, A. L. de Lacey, B. Burlat, L. Cournac, P. Richaud, M. Brugna, V. M. Fernández, B. Guigliarelli, M. Rousset, C. Léger, S. Dementin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 986–997; c) T. Sakai, D. Mersch, E. Reisner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12313–12316; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12539–12542; d) T. Liu, B. Li,

- M. L. Singleton, M. B. Hall, M. Y. Daresbourg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8296–8307.
- [7] S. V. Hexter, F. Grey, T. Happe, V. Climent, F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11516–11521.
- [8] N. Plumeré, O. Rüdiger, A. A. Oughli, R. Williams, J. Vivekananthan, S. Pöller, W. Schuhmann, W. Lubitz, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 822–827.
- [9] V. Fourmond, S. Stapf, H. Li, D. Buesen, J. Birrell, O. Rüdiger, W. Lubitz, W. Schuhmann, N. Plumeré, C. Léger, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5494–5505.
- [10] D. W. Mulder, E. S. Boyd, R. Sarma, R. K. Lange, J. A. Endrizzi, J. B. Broderick, J. W. Peters, *Nature* **2010**, *465*, 248–252.
- [11] S. V. Morozov, O. G. Voronin, E. E. Karyakina, N. A. Zorin, S. Cosnier, A. A. Karyakin, *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 851–854.
- [12] V. Radu, S. Frielingdorf, S. D. Evans, O. Lenz, L. J. C. Jeuken, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8512–8515.
- [13] K. A. Vincent, A. Parkin, O. Lenz, S. P. J. Albracht, J. C. Fontecilla-Camps, R. Cammack, B. Friedrich, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18179–18189.
- [14] D. W. Wakerley, M. A. Gross, E. Reisner, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15995–15998.
- [15] S. T. Stripp, G. Goldet, C. Brandmayr, O. Sanganas, K. A. Vincent, M. Haumann, F. A. Armstrong, T. Happe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17331–17336.
- [16] J. Baur, A. Le Goff, S. Dementin, M. Holzinger, M. Rousset, S. Cosnier, *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 12096–12101.
- [17] V. Fourmond, C. Greco, K. Sybirna, C. Baffert, P.-H. Wang, P. Ezanno, M. Montefiori, M. Bruschi, I. Meynil-Salles, P. Soucaille, J. Blumberger, H. Bottin, L. De Gioia, C. Léger, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 336–342.
- [18] N. Lalaoui, A. de Pouliquet, R. Haddad, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Gounel, M. Mermoux, P. Infossi, N. Mano, E. Lojou, S. Cosnier, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7447–7450.
- [19] T. Kothe, S. Poeller, F. Zhao, P. Fortgang, M. Roegner, W. Schuhmann, N. Plumeré, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11029–11034.
- [20] C. Madden, M. D. Vaughn, I. Díez-Pérez, K. A. Brown, P. W. King, D. Gust, A. L. Moore, T. A. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1577–1582.
- [21] A. F. Wait, A. Parkin, G. M. Morley, L. dos Santos, F. A. Armstrong, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 12003–12009.
- [22] R. P. Ramasamy, H. R. Luckarift, D. M. Ivnitski, P. B. Atanassov, G. R. Johnson, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6045–6047.
- [23] C. Lambertz, N. Leidel, K. G. V. Havelius, J. Noth, P. Chernev, M. Winkler, T. Happe, M. Haumann, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 40614–40623.
- [24] T. Lautier, P. Ezanno, C. Baffert, V. Fourmond, L. Cournac, J. C. Fontecilla-Camps, P. Soucaille, P. Bertrand, I. Meynil-Salles, C. Léger, *Faraday Discuss.* **2011**, *148*, 385–407.
- [25] a) J. A. Stapleton, J. R. Swartz, *Plos One* **2010**, *5*(5), e10554; b) A. S. Bingham, P. R. Smith, J. R. Swartz, *Int. J. Hydrogen Energy* **2012**, *37*, 2965–2976.
- [26] J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439–2461.
- [27] T. Noji, M. Kondo, T. Jin, T. Yazawa, H. Osuka, Y. Higuchi, M. Nango, S. Itoh, T. Dewa, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 2402–2407.
- [28] R. Thorneley, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1974**, *333*, 487–496.
- [29] a) E. J. Nanni, C. T. Angelis, J. Dickson, D. T. Sawyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4268–4270; b) C. L. Bird, A. T. Kuhn, *Chem. Soc. Rev.* **1981**, *10*, 49–82.

Eingegangen am 26. März 2015
Online veröffentlicht am 12. Juni 2015