

# Direkter Leistungsvergleich eines bioinspirierten synthetischen Ni-Katalysators und einer [NiFe]-Hydrogenase, beide kovalent an eine Elektrode gebunden\*\*

Patricia Rodriguez-Maciá, Arnab Dutta, Wolfgang Lubitz, Wendy J. Shaw\* und Olaf Rüdiger\*

**Abstract:** Das aktive Zentrum von Hydrogenasen inspiriert die Entwicklung molekularer Katalysatoren zur Wasserstoffumsetzung. Ein direkter Vergleich zwischen diesen Katalysatoren und dem Enzym war jedoch bisher nicht möglich, weil verschiedene Techniken zur Bewertung der Katalysatoreigenschaften verwendet wurden. Dies macht es schwierig zu beurteilen, inwieweit die synthetisierten Katalysatoren in ihrer Leistung an das Enzym heranreichen. Hier vergleichen wir die katalytischen Eigenschaften von  $\text{Ni}[(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  mit denen der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris*. Beide wurden auf funktionalisierten Elektroden unter identischen Bedingungen immobilisiert. Das Enzym zeigt bei pH 7 eine höhere Aktivität, geringere Überspannung und eine bessere Stabilität, während bei niedrigem pH-Wert der molekulare Katalysator das Enzym in jeder Hinsicht übertrifft. Dieser erste direkte Vergleich gibt Auskunft über die Vor- und Nachteile der beiden Systeme und Hinweise auf eine mögliche Verwendung bioinspirierter Komplexe in Brennstoffzellen.

Wasserstoff hat sich in den letzten Jahren als guter Kandidat für eine nachhaltige Energiewirtschaft herausgestellt. Energie aus erneuerbaren Energiequellen kann in der H-H Bindung gespeichert und später in Brennstoffzellen oder bei anderen chemischen Umwandlungen wie der Bildung von Ammoniak oder der Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu Kohlenwasserstoffen genutzt werden.<sup>[1]</sup> Zurzeit wird noch das seltene und teure Edelmetall Platin in Brennstoffzellen verwendet, doch die Suche nach alternativen effizienten Katalysatoren auf Basis von häufigen und preiswerten Metallen ist für die Wasserstoffproduktion oder -umsetzung ein wichtiges For-

schungsziel. Hydrogenasen sind Metalloenzyme, sie katalysieren die reversible Oxidation von molekularem Wasserstoff zu Protonen und Elektronen [Gl. (1)].



Die Reaktionen finden an spezialisierten Ni- und/oder Fe-haltigen aktiven Zentren statt, welche die Acidität von  $\text{H}_2$  stark erhöhen und zu dessen heterolytischer Spaltung führen.<sup>[2]</sup> Beschleunigt wird diese Reaktion durch eine benachbarte Base (Amin bei [FeFe]-Hydrogenasen<sup>[3]</sup> oder Cystein-Schwefel bei [NiFe]-Hydrogenasen).<sup>[4,5]</sup> Zusätzlich enthält das Proteingerüst eine Reihe strategisch positionierter Fe-S-Cluster, um Elektronen zwischen dem aktiven Zentrum und der Oberfläche des Proteins zu übertragen, sowie polarer/saurer Aminosäurereste für den  $\text{H}^+$ -Transport.<sup>[2]</sup> Diese optimierte Anordnung ermöglicht Hydrogenasen, Umsatzfrequenzen (TOFs) von  $20000 \text{ s}^{-1}$  bei minimaler Überspannung ( $\eta$ )<sup>[6]</sup> zu erreichen. Diese Werte übertreffen sogar jene für Pt in Polymerelektrolyt-Brennstoffzellen.<sup>[7]</sup>

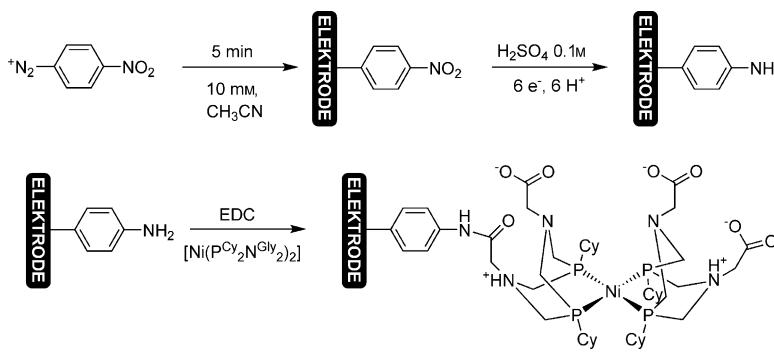
Kürzlich publizierte Arbeiten zur semi-artifiziellen Reifung von Hydrogenasen haben gezeigt, dass das Proteingerüst eine entscheidende Rolle für die Effizienz des aktiven Zentrums spielt.<sup>[8]</sup> Ein weiterer Beleg für die Bedeutung der äußeren Koordinationsphäre wurde auch durch die bioinspirierte Synthese von  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{R}}_2\text{N}^{\text{R}'}_2)_2]^{2+}$  gefunden ( $\text{P}_2\text{N}_2 = 1,5\text{-D}i\text{aza-3,7-diphosphacyclooctan}$ ). Dieser Komplex enthält eine Aminfunktion, die auch in der zweiten Koordinationsphäre der [FeFe]-Hydrogenase vorhanden ist; sie erleichtert den Protonentransport zum und vom aktiven Zentrum.<sup>[9]</sup> Die katalytische Leistung dieser Ni-Komplexe wurde durch die Einführung eines Peptids oder einer Aminosäure in die äußere Koordinationsphäre weiter verbessert.<sup>[10]</sup> Die Bindung einer einzigen Aminosäure an die Aminogruppen von  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{R}}_2\text{N}^{\text{R}'}_2)_2]^{2+}$  erzeugt einen minimalen  $\text{H}^+$ -Transportweg, wodurch die Wasserlöslichkeit erhöht, die Reaktion beschleunigt und die Überspannung minimiert wird.<sup>[11]</sup>

Wir vergleichen hier die katalytische Leistung des  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{R}}_2\text{N}^{\text{R}'}_2)_2]^{2+}$ -Komplexes direkt mit der des Enzyms. Die Carbonsäuregruppen des Katalysators mit vier Glycinen (Gly),  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  ( $\text{Cy} = \text{Cyclohexyl}$ ),<sup>[11c]</sup> wurden verwendet, um den Komplex kovalent an die funktionalisierte Kohlenstoffelektrode zu binden (Schema 1 und Hintergrundinformationen). Diese Methode wurde auch für die [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (*DvMF*) genutzt.<sup>[12]</sup> Die Immobilisierung wurde in Wasser durchgeführt und bietet eine einfache und enzymfreundliche Alternative zur Bindung ähnlicher Katalysatoren, die bisher nur unter Verwendung organischer Lösungsmittel durchge-

[\*] P. Rodriguez-Maciá, 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. A. Dutta, Dr. W. J. Shaw  
Pacific Northwest National Laboratory  
902 Battelle Blvd., Richland, WA 99354 (USA)  
E-Mail: Wendy.Shaw@pnnl.gov

[\*\*] Wir danken Patricia Malkowski für die Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase aus *DvMF*, Birgit Nöring für die technische Unterstützung und Adnan Sarfaz vom MPI für Eisenforschung für die XPS-Messungen. P.R., W.L. und O.R. danken der MPG und dem Exzellenzcluster RESOLV (EXC1069) der DFG für finanzielle Unterstützung. A.D. und W.J.S. danken für die finanzielle Unterstützung durch das Office of Science Early Career Research Program des US DOE, Office of Science, Office of BES. Das PNNL wird durch Battelle für das US-Energieministerium betrieben.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502364> zu finden.



**Schema 1.** Kovalente Immobilisierung des  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$ -Katalysators an einer Kohlenstoffelektrode; EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid. Schema S1 zeigt zusätzliche Bindeoptionen.

führt wurde.<sup>[13]</sup> Dies ermöglichte erstmals den Vergleich der Leistung des Katalysators mit der des Enzyms unter identischen Bedingungen.

Nach der Immobilisierung von  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  an der Elektrode zeigten die unter  $\text{N}_2$  gemessenen Cyclovoltammogramme (CVs) in Abbildung 1 (Details siehe Abbildung S1 und Experimenteller Teil der Hintergrundinformationen) einen reversiblen Übergang bei  $-263 \text{ mV}$  (bei pH 7.0) mit einer Halbwertsbreite von  $91 \text{ mV}$ .<sup>[14]</sup> Diese Signale wurden zwei überlappenden Ein-Elektronen-Prozessen in der Lösung aus der Reduktion von  $\text{Ni}^{II}$  zu  $\text{Ni}^0$  zugeordnet.<sup>[11c]</sup> Die Intensität des Spitzenswertes variiert linear mit der Abtastrate, wie dies bei einer komplexen Bindung an einer Oberfläche (Abbildung S2) erwartet wird.<sup>[14]</sup> Die Integration der Fläche unter diesen Kurven liefert ein direktes Maß der Oberflächenkonzentration des immobilisierten Katalysators.

Die Immobilisierung von Lösungen mit  $\geq 1 \text{ mM}$  ergab eine Katalysatoroberflächenbeschichtung von  $(21 \pm 7) \text{ pmol cm}^{-2}$  (Zahl der Experimente: 5). Werte gleicher Größenordnung wurden schon für ähnliche Kompleximmobilisierungen auf Oberflächen beschrieben.<sup>[13]</sup> Die Umsatzfrequenz (TOF) bei pH 7 ist  $10 \text{ s}^{-1}$ , erhöht sich aber unter starker sauren Bedingungen (Tabelle 1). Die Ergebnisse stimmen mit der Leistungsfähigkeit des Katalysators in Lösung überein, jedoch mit leicht höheren Werten bei niedrigerem pH-Wert. Die TOFs wurden anhand des  $i_{\text{cat}}$ -Werts und der gemessenen Beschichtung für jede einzelne Elektrode unter Verwendung von Gleichung (2) bestimmt, unter

**Tabelle 1:** Überspannung ( $\eta$ ) und TOF-Werte für kovalent an der Elektrode immobilisiertes oder in Lösung bei  $25^\circ\text{C}$  befindliches  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$ .<sup>[11c]</sup>

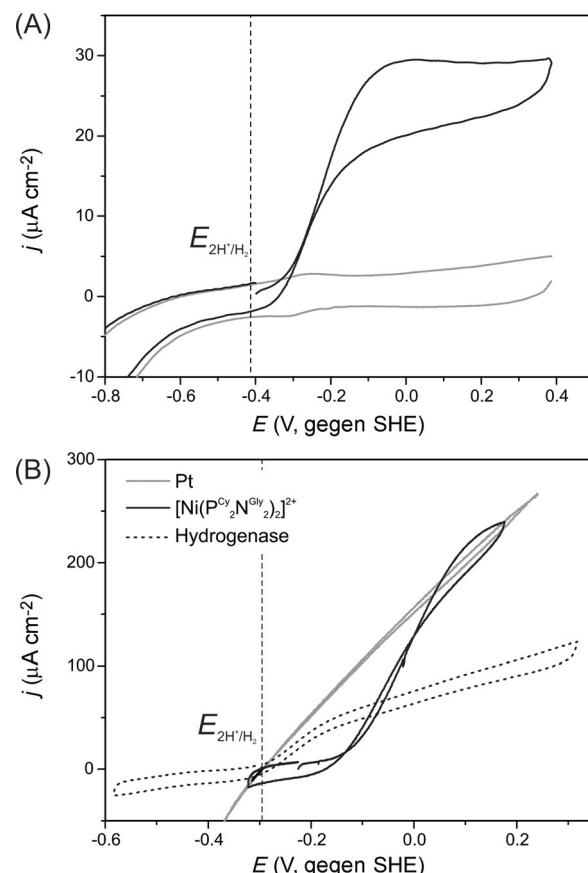
pH	$\eta$ kovalent <sup>[a]</sup> [mV]	$\eta$ Lösung <sup>[b]</sup> [mV]	TOF kovalent <sup>[a]</sup> [s <sup>-1</sup> ]	TOF Lösung <sup>[b]</sup> [s <sup>-1</sup> ]
2	174	160	66	21
3	225	n.b.	26	n.b.
3.5	n.b.	240	n.b.	3
4	217	n.b.	10	n.b.
5	207	265	4	5
6	197	270	4	6
7	231	285	10	8
8	237	325	14	7

[a] Diese Arbeit. [b] Quellenangabe.<sup>[11c]</sup> n.b. = nicht bestimmt.

der Annahme einer Reaktion erster Ordnung abhängig von der Katalysatoroberflächenbedeckung ( $\Gamma$ ), wobei  $n$  die Anzahl der Elektronen pro Umsatz (2),  $F$  die Faradaysche Konstante und  $A$  die Oberfläche der Elektrode ( $0.196 \text{ cm}^2$ ) ist. Der gemessene katalytische Strom war unabhängig von der Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode (Rotationsgeschwindigkeit über  $1500 \text{ UpM}$ ; Abbildung S3). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Katalyse nicht durch Substratdiffusion zur Elektrode begrenzt wird.

$$\text{TOF} = \frac{i_{\text{cat}}}{nFA\Gamma} \quad (2)$$

Die TOF-Werte für die Hydrogenase-modifizierten Elektroden konnten nicht bestimmt



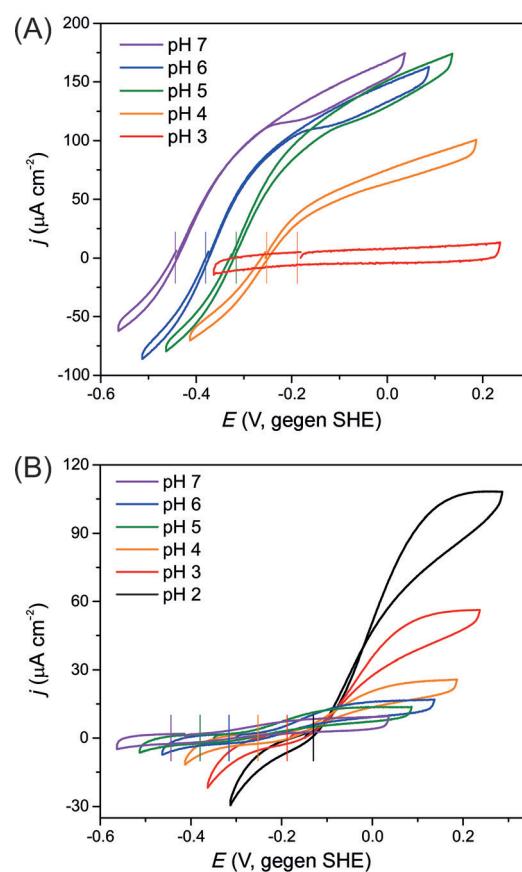
**Abbildung 1.** A) CVs einer kovalent mit  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  modifizierten HOPG-Elektrode unter  $\text{N}_2$  (—) und 1 bar  $\text{H}_2$  (—), gemessen mit  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , pH 7.0,  $0.1 \text{ M HClO}_4$  und  $2000 \text{ UpM}$  Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode (SHE = Standard-Wasserstoffelektrode). B) CV-Messungen an einer Pt-Scheibenelektrode (—) sowie einer Elektrode, die mit DvMF-[NiFe]-Hydrogenase (----) und  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  (—) modifiziert ist. Die Potentialen der Katalysatoren können hier direkt verglichen werden. Experimentelle Bedingungen:  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , pH 5.0,  $0.1 \text{ M Na}_2\text{SO}_4/0.1 \text{ M MES/HEPES}$  [MES=2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, HEPES=2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure], 1 bar  $\text{H}_2$ ,  $25^\circ\text{C}$  und  $2000 \text{ UpM}$  Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode. Die vertikalen gestrichelten Linien zeigen das Gleichgewichtspotential für das  $2\text{H}^+/\text{H}_2$ -Paar.

werden. Diese werden idealerweise unter Verwendung der Signale aus der Reduktion der [FeS]-Cluster ermittelt, allerdings konnten hier keine katalytischen Signale der [FeS]-Cluster detektiert werden, was auf eine niedrige Hydrogenase-Oberflächenbeschichtung zurückzuführen ist. Eine Enzymbeschichtung von  $0.6 \text{ pmol cm}^{-2}$  auf den Elektroden kann aus der Enzymaktivität in Lösung und dem  $\text{H}_2$ -Oxidationskatalysatorstrom im CV der Hydrogenase-modifizierten Elektrode unter Verwendung von Gleichung (2) bestimmt werden ( $729 \text{ s}^{-1}$  bei pH 7.6 und  $25^\circ\text{C}$  in Gegenwart von Benzylviologen als Elektronenakzeptor). Von höheren Beschichtungen ( $1\text{--}3 \text{ pmol cm}^{-2}$ ) für ähnliche Hydrogenasen wurde bereits berichtet.<sup>[15]</sup> Auch wenn eine höhere Beschichtung angenommen wird, ist die Geschwindigkeit der *DvMF*-Hydrogenase immer noch mehr als eine Größenordnung höher als die des Ni-Komplexes bei pH 7.0 unter identischen Bedingungen. Normalerweise sinkt bei Hydrogenasen<sup>[16]</sup> der katalytische Strom für die  $\text{H}_2$ -Oxidation bei niedrigeren pH-Werten, und wenn der pH-Wert unter 4.0 gesenkt wird, geht die Aktivität des Enzyms infolge von Proteindennaturierung irreversibel verloren.

Auch wenn das auf der Elektrode immobilisierte  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  eine niedrigere TOF im neutralen pH-Bereich hat, zeigten sich doch höhere katalytische Ströme als für die Hydrogenase-modifizierte Elektrode (Abbildung 1B). Diese Beobachtung kann durch die Größe der beiden Katalysatoren erklärt werden: Das Molekulargewicht für die Hydrogenase beträgt 90 kDa und der Durchmesser etwa  $45 \text{ \AA}$ .<sup>[5]</sup> Im Fall von  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  liegt der Wert dagegen bei ca. 1 kDa. Dies ergibt eine etwa 30-mal höhere Beschichtung für den synthetischen Katalysator, was ein entscheidender Vorteil für den Molekülkomplex in der Anwendung ist. Um eine so hohe Beschichtung für Hydrogenasen zu erreichen, wäre eine dreidimensionale Polymermatrix erforderlich.

Abbildung 1B zeigt die CVs der  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$ - und Hydrogenase-modifizierten Elektroden sowie einer Pt-Elektrode für einen direkten Vergleich der Überspannung des Katalysators und der Hydrogenase. Pt, ein sehr effizienter reversibler Katalysator, wird als Referenz verwendet.<sup>[17]</sup> Die Hydrogenase beginnt bei pH 5.0 fast ohne Überspannung,  $\text{H}_2$  zu oxidieren, während das Potential für  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  unter den gleichen Bedingungen 146 mV positiver ist. Abbildung S4 zeigt die erhaltenen CVs bei pH 7.0–2.1 unter 1 bar  $\text{H}_2$  bei  $25^\circ\text{C}$ . Für das Enzym verschiebt sich das Potential um 60 mV pro pH-Wert, entsprechend der Erwartung nach der Nernst-Gleichung.<sup>[18]</sup> Die Überspannung ( $\eta$ ) für den immobilisierten  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$ -Katalysator zeigt eine geringere Abhängigkeit vom pH-Wert (pH 2.1–8.0) als der gleiche Komplex in Lösung. Dies liegt an dem verbesserten Elektronentransfer zwischen dem Katalysator und der Elektrode nach der Immobilisierung (Tabelle 1). Die Überspannung wurde unter Verwendung der gleichen Methode wie bei Appel et al.<sup>[19]</sup> bestimmt.

Die  $\text{H}_2$ -Erzeugung durch die [NiFe]-Hydrogenase aus *DvMF* wird durch die Gegenwart von  $\text{H}_2$  in der Lösung stark gehemmt.<sup>[20]</sup> Das Verdünnen von  $[\text{H}_2]$  auf 50% mit  $\text{N}_2$  führt zu einer Verminderung des Stroms an dem erwarteten thermodynamischen Potential für die  $\text{H}^+$ -Reduktion, womit das CV den Nullstromwert quert (Abbildung 2A). Dies wurde



**Abbildung 2.** CVs einer HOPG-Elektrode, die kovalent mit  $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenase aus *DvMF* (A) oder mit  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$  (B) modifiziert ist, aufgezeichnet für verschiedene pH-Werte mit  $20 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 1 bar 50%  $\text{H}_2$  in  $\text{N}_2$  mit einem Gesamtgasstrom von  $1500 \text{ mL min}^{-1}$  und einer Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode von 2000 UpM. Die vertikalen Linien zeigen die thermodynamischen Redoxpotentiale für die  $\text{H}^+$ -Reduktionsreaktion bei jedem pH-Wert.

bei  $50^\circ\text{C}$  aufgezeichnet, um die Geschwindigkeit der  $\text{H}_2$ -Produktion für den Ni-Komplex zu erhöhen, und konnte auch bei  $25^\circ\text{C}$  beobachtet werden. Der  $[\text{Ni}(\text{P}^{\text{Cy}}_2\text{N}^{\text{Gly}}_2)_2]^{2+}$ -Katalysator zeigt einen geringeren Strom bei niedrigen pH-Werten und  $50^\circ\text{C}$  (Abbildungen 2B und S6). Er arbeitet an dem Gleichgewichtspotential für die  $\text{H}_2$ -Oxidation und -Produktion, ein Verhalten, das bei Raumtemperatur nicht beobachtet wurde (Abbildung 1B). Der Komplex arbeitet ebenfalls reversibel bei erhöhten Temperaturen in Lösung, was zudem darauf schließen lässt, dass die Immobilisierung die katalytische Leistung nicht verändert.<sup>[11b]</sup> Es wurde kein Plateau des Stroms bei der  $\text{H}_2$ -Produktion erreicht, auch nicht bei Messungen bei niedrigeren Potentialen (Abbildung S6). Dies konnte übereinstimmend an zwei verschiedenen (und etwas überlappenden) Prozessen zur  $\text{H}_2$ -Produktion auch in Lösung beobachtet werden: eine, die reversibel ist, und eine zweite, die bei einer höheren Überspannung (beginnend bei  $-250 \text{ mV}$  bei pH 2; Abbildung 2) arbeitet und nicht Teil des reversiblen Prozesses ist.<sup>[11b]</sup> TOF und  $\eta$  für die  $\text{H}_2$ -Produktion durch den Ni-Katalysator wurden aufgrund der komplizierten Natur dieser Übergänge nicht bestimmt.

Ein Aspekt, der im Detail an Oberflächen-immobilisierten Katalysatoren untersucht werden kann, ist die Langzeit-

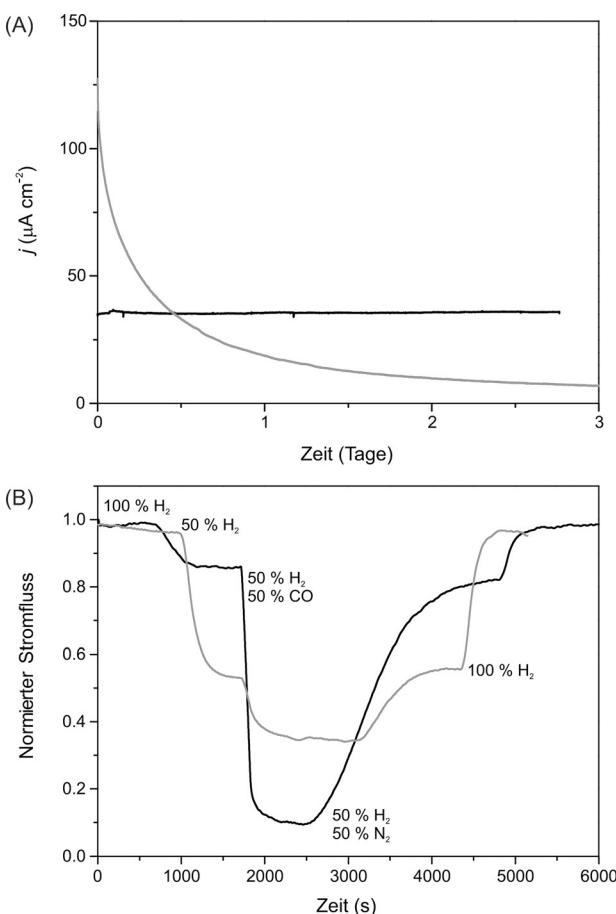
stabilität. Wird diese in Lösung gemessen, wirkt der Großteil der Lösung als Reservoir für „frischen“ Katalysator, wodurch Katalysatorabbauprozesse verhindert werden. Dies ist nicht der Fall, wenn nur eine kleine Menge des Katalysators auf der Oberfläche der Elektrode vorhanden ist, wie im aktuellen Experiment. Während die immobilisierte Hydrogenase sehr stabil ist, basierend auf dem über drei Tage konstanten Strom zur  $H_2$ -Oxidation in einem chronoamperometrischen Experiment, ist der katalytische Strom für den immobilisierten Katalysator in etwa sechs Stunden auf 25 % gefallen (Abbildung 3A).

Um die Stabilität des immobilisierten Ni-Komplexes detaillierter zu untersuchen, wurden zehn aufeinander folgende CVs gemessen und die Ni-Redoxübergänge unter nichtkatalytischen Bedingungen verfolgt. Die Fläche des Ni-Oxidations-/Reduktionsspitzenwerts blieb während des Experiments konstant (nur weniger als 2 % der anodischen Peak-

fläche gingen verloren; Abbildung S7). Andererseits nahmen die katalytischen Oxidations- und Reduktionsströme bei aufeinander folgenden Messungen rasch ab, wenn mehrere CVs unter  $H_2$  gemessen wurden, während der  $H^+$ -Reduktionsstrom bei niedrigen Potentialen konstant blieb (Abbildung S8). Die Zersetzung war langsamer, wenn bei 25 °C, pH 2.1 und 25 %  $H_2$  (Abbildung S8) gemessen wurde. Diese Befunde legen nahe, dass der für die  $H_2$ -Oxidation verantwortliche Katalysator irreversibel abgebaut wird, sich aber weitere Spezies bilden, die immer noch in der Lage sind,  $H^+$  bei höherer Überspannung zu reduzieren.

Die Zersetzung wurde auch mit Röntgenphotoelektronspektroskopie (XPS) untersucht. Hierbei wurde eine Schulter auf der  $Ni-2p_{3/2}$ -Region, die charakteristisch für  $Ni^{0+}$ -Spezies ist (851.2 eV),<sup>[21]</sup> in den Spektren einer HOPG-„edge“-Scheibenelektrode (HOPG = hochorientierter pyrolytischer Graphit) gefunden, an der die  $H_2$ -Oxidation bis zum vollständigen Verschwinden des Stroms überwacht wurde. Diese Schulter konnte nicht in den Spektren des immobilisierten Katalysators gefunden werden, wenn nicht unter katalytischen Bedingungen gemessen wurde (Abbildung S9 und Tabelle S2). Um eine Desorption als Ursache für einen Signalverlust auszuschließen, wurde die Stabilität der kovalenten Bindung zwischen dem Katalysator und der Elektrode mithilfe oberflächenverstärkter Infrarot-Absorptionsspektroskopie (SEIRAS) untersucht. Die Verwendung einer Goldoberfläche, die mit einer selbstorganisierten Monoschicht (SAM) von 4-Aminothiophenol (4-ATP) modifiziert wurde,<sup>[22]</sup> ermöglichte die Überwachung der Bildung einer Amidbande und ihrer Stabilität durch eine chronoamperometrische Messung. Die aufgezeichneten Spektren (Abbildung S10) zeigen eine unveränderte Intensität der Bande der Amid-CO-Gruppe für die Dauer der chronoamperometrischen Messung; dagegen nimmt der katalytische  $H_2$ -Oxidationsstrom nach zwei Stunden signifikant ab. Auf Basis der aktuellen Befunde kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Immobilisierungsmethode eine starre Konformation von  $[Ni(P^{Cy}_2N^{Gly}_2)_2]^{2+}$  durch die mehrfachen Carboxylatbindungen an die Elektrode erzeugt (Schema S1);<sup>[23]</sup> dies kann die Abbauzeit beschleunigen. Versuche, die einen Einblick in den Abbaumechanismus ermöglichen, dauern noch an.

Die Katalysatorstabilität in Gegenwart von Verunreinigungen in der Brennstoffzufuhr ist auch ein wichtiger Gesichtspunkt für die praktische Anwendung. Standardhydrogenasen wie die aus *DvMF* werden stark von CO gehemmt, das die freie Bindungsstelle durch Bindung an das Ni-Zentrum im Ni-C- oder Ni-SI<sub>a</sub>-Zustand blockiert.<sup>[2]</sup> Im Unterschied zu Pt-Katalysatoren, die ein hohes Oxidationspotential erfordern, um das adsorbierte CO zu entfernen,<sup>[24]</sup> werden [NiFe]-Hydrogenasen bei einer Verdrängung des CO vollständig reaktiviert. Die so genannten sauerstofftoleranten Hydrogenasen behalten ihre Aktivität sogar in Gegenwart von CO.<sup>[25]</sup> Es zeigte sich, dass CO die  $H_2$ -Oxidationsaktivität von  $[Ni(P^{Cy}_2N^{Gly}_2)_2]^{2+}$  hemmt, dies aber in geringerem Ausmaß als bei *DvMF*. Diese Hemmung ist ebenfalls vollständig reversibel; dies wurde in Lösung<sup>[11a, 26]</sup> oder immobilisiert auf Kohlenstoff-Nanoröhrchen<sup>[27]</sup> beobachtet. Gegenüber Edelmetallkatalysatoren bietet dies einen zusätzlichen



**Abbildung 3.** Chronoamperometrische Messungen an HOPG-Elektroden, die kovalent mit  $[Ni(P^{Cy}_2N^{Gly}_2)_2]^{2+}$  (—;  $E = 0$  V gegen SHE) und [NiFe]-Hydrogenase aus *DvMF* (—;  $E = -0.21$  V gegen SHE) modifiziert wurden, um die Stabilität des Katalysators für die  $H_2$ -Oxidationskatalyse auf der Elektrode (A) und die  $H_2$ -Oxidationshemmung durch CO zu studieren (B). Die Änderung der Gaszusammensetzung ist in der Abbildung angegeben; der Gesamtgasfluss durch die Zelle betrug  $1500 \text{ mL min}^{-1}$ . Alle Daten wurden aufgezeichnet bei 25 °C, 2000 UpM Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode und optimalen Bedingungen für den jeweiligen Katalysator, z. B.: pH 2.1, 0.1 M  $\text{HClO}_4$  für den Ni-Katalysator und pH 7.0, 0.1 M  $\text{NaSO}_4$ /0.1 M MES/HEPES für die Hydrogenase-Elektrode.

praktischen Vorteil, da bei Verwendung von Ni-Katalysatoren in einer Brennstoffzelle H<sub>2</sub> niedrigerer Reinheit aus der Dampfreformierung verwendet werden kann.

Sauerstoff ist ein bekannter Hemmstoff der Hydrogenasen. Abbildung S11 zeigt die rasche Inaktivierung der Hydrogenase aus *DvMF* durch O<sub>2</sub>; dieser Vorgang ist teilweise reversibel und führt zur Bildung von mehreren inaktiven Zuständen, die durch reduktive Behandlung (H<sub>2</sub>) wieder reaktiviert werden können.<sup>[2]</sup> [Ni(P<sup>Cy</sup><sub>2</sub>N<sup>Gly</sup><sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> reagiert langsamer als die Hydrogenase mit O<sub>2</sub>, allerdings ist seine Inaktivierung irreversibel, was auf die Oxidation der Diphosphinliganden an Luft zurückgeführt wird, die zu einer Dissoziation des Komplexes führt.<sup>[28]</sup>

Wir haben hier über den ersten direkten elektrochemischen Vergleich zwischen einem bioinspirierten synthetischen Katalysator und einer [NiFe]-Hydrogenase berichtet, die durch einfache chemische Prozesse in identischer Weise auf Elektroden immobilisiert wurden. Die Überspannung der H<sub>2</sub>-Oxidation des Ni-Katalysators konnte eindeutig gemessen und direkt mit jener der Hydrogenase verglichen werden. Beide Katalysatoren arbeiten beim Gleichgewichtspotential unter ihren jeweils optimalen Bedingungen (geringer pH-Wert/erhöhte Temperatur für den Ni-Komplex und neutraler pH-Wert für die Hydrogenase). Der katalytische Leistungsvergleich mit der Hydrogenase unterstreicht die bemerkenswerte Effizienz dieser Ni-Katalysatoren, die bei niedrigen pH-Werten und in Gegenwart von großen Mengen an CO besser als die der [NiFe]-Hydrogenase aus *DvMF* ist. Diese Eigenschaften zeigen, dass die Ni-Katalysatoren ideale Kandidaten für Brennstoffzellen mit Protonenaustauschmembranen (PEM) sind, in denen niedrige pH-Werte und hohe Temperaturen vorherrschen. Außerdem kann kostengünstiger Wasserstoff geringerer Reinheit als Brennstoff verwendet werden. Die Probleme mit der Langzeitstabilität des Katalysators und seiner O<sub>2</sub>-Empfindlichkeit müssen allerdings noch gelöst werden.

**Stichwörter:** Enzymkatalyse · Hydrogenasen · Molekulare Katalyse · Oberflächenimmobilisierte Katalyse · Oxidationen

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12303–12307  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12478–12482

- [1] a) N. S. Lewis, D. G. Nocera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15729–15735; b) J. J. Concepcion, R. L. House, J. M. Panikolas, T. J. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15560–15564.
- [2] W. Lubitz, H. Ogata, O. Rüdiger, E. Reijerse, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4081–4148.
- [3] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, W. Lubitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6592–6599.
- [4] K. Weber, T. Krämer, H. S. Shafaat, T. Weyhermüller, E. Bill, M. van Gastel, F. Neese, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20745–20755.
- [5] H. Ogata, K. Nishikawa, W. Lubitz, *Nature* **2015**, *520*, 571–574.

- [6] 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.
- [7] T. Matsumoto, S. Eguchi, H. Nakai, T. Hibino, K.-S. Yoon, S. Ogo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8895–8898; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 9041–9044.
- [8] a) G. Berggren, T. Simmons, A. Adamska, C. Lambertz, J. Esselborn, M. Atta, S. Gambarelli, J. M. Mouesca, E. J. Reijerse, W. Lubitz, T. Happe, V. Artero, M. Fontecave, *Nature* **2013**, *499*, 66–69; b) J. Esselborn, C. Lambertz, A. Adamska, T. Simmons, G. Berggren, J. Noth, J. F. Siebel, A. Hemschemeier, V. Artero, E. J. Reijerse, M. Fontecave, W. Lubitz, T. Happe, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 607–609.
- [9] D. L. DuBois, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 3935–3960.
- [10] B. Ginoyska-Pangovska, A. Dutta, M. L. Reback, J. C. Linehan, W. J. Shaw, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2621–2630.
- [11] a) A. Dutta, J. A. S. Roberts, W. J. Shaw, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6487–6491; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 6605–6609; b) A. Dutta, D. L. DuBois, J. A. S. Roberts, W. J. Shaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 16286–16291; c) A. Dutta, S. Lense, J. Hou, M. H. Engelhard, J. A. S. Roberts, W. J. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18490–18496.
- [12] O. Rüdiger, J. M. Abad, E. C. Hatchikian, V. M. Fernández, A. L. de Lacey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16008–16009.
- [13] A. K. Das, M. H. Engelhard, R. M. Bullock, J. A. S. Roberts, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 6875–6885.
- [14] E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101*, 19–28.
- [15] a) H. R. Pershad, J. L. C. Duff, H. A. Heering, E. C. Duin, S. P. J. Albracht, F. A. Armstrong, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8992–8999; b) A. Parkin, G. Goldet, C. Cavazza, J. C. Fontecilla-Camps, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13410–13416.
- [16] K. A. Vincent, A. Parkin, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4366–4413.
- [17] A. K. Jones, E. Sillery, S. P. J. Albracht, F. A. Armstrong, *Chem. Commun.* **2002**, 866–867.
- [18] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Elektrochemische Methoden: Grundlagen und Anwendungen*, 2. Aufl., Wiley, New York, **2001**.
- [19] A. M. Appel, M. L. Helm, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 630–633.
- [20] H. S. Shafaat, O. Rüdiger, H. Ogata, W. Lubitz, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2013**, *1827*, 986–1002.
- [21] A. P. Grosvenor, M. C. Biesinger, R. S. Smart, N. S. McIntyre, *Surf. Sci.* **2006**, *600*, 1771–1779.
- [22] O. Gutiérrez-Sanz, M. Marques, I. A. C. Pereira, A. L. de Lacey, W. Lubitz, O. Rüdiger, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2794–2798.
- [23] D. H. Pool, D. L. DuBois, *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 2858–2865.
- [24] J. J. Baschuk, X. G. Li, *Int. J. Energy Res.* **2001**, *25*, 695–713.
- [25] K. A. Vincent, J. A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16951–16954.
- [26] a) A. D. Wilson, K. Fraze, B. Twamley, S. M. Miller, D. L. DuBois, M. Rakowski DuBois, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1061–1068; b) D. W. Wakerley, M. A. Gross, E. Reisner, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15995–15998.
- [27] P. D. Tran, A. Le Goff, J. Heidkamp, B. Jousselme, N. Guillet, S. Palacin, H. Dau, M. Fontecave, V. Artero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1371–1374; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1407–1410.
- [28] J. Y. Yang, R. M. Bullock, W. G. Dougherty, W. S. Kassel, B. Twamley, D. L. DuBois, M. Rakowski DuBois, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 3001–3010.

Eingegangen am 13. März 2015  
 Online veröffentlicht am 3. Juli 2015