

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Forschung, Technologie  
und Raumfahrt

## Zuwendungsempfänger:

Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Institutsteil Straubing  
Bio-, Elektro- und Chemokatalyse BioCat  
Schulgasse 11 a  
94315 Straubing

## Titel der Förderung:

SynHydro<sup>3</sup> – Synthesepattform unter Verwendung von Wasserstoff, Hydrogenasen und Hydrogelen  
(Teilprojekt B)

## Verantwortliche Autoren:

Dr. Melanie Iwanow

## Förderkennzeichen:

031B1123B

**„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B1123B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“**

**Sachbericht zum Verwendungsnachweis – Teil I**

**30.06.2025**

<b>ZE:</b>  Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Bio-, Elektro- und Chemokatalyse BioCat Schulgasse 11 a 94315 Straubing	<b>FKZ:</b>  031B1123B
<b>Vorhabenbezeichnung:</b> IBZT-01: SynHydro <sup>3</sup> – Syntheseplattform unter Verwendung von Wasserstoff, Hydrogenasen und Hydrogelen (Teilprojekt B)	
<b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.10.2021 - 31.12.2024	
<b>Berichtszeitraum:</b> 01.10.2021 - 31.12.2024	

**Unterschrift des Projektleiters des Zuwendungsempfängers**

Straubing, den 30.06.2025

\_\_\_\_\_  
Dr. Melanie Iwanow

## **1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie den wissenschaftlich und technischen Stand, an den angeknüpft wurde**

Eine von Wasserstoff getriebene Biokatalyse, in Form einer robusten, modularen und skalierbaren Plattformtechnologie, stellt einen Eckpfeiler in der (großtechnischen) chemischen Synthese dar. Da bisher hochaktive, robuste und skalierbare  $H_2$ -oxidierende Biokatalysatoren fehlen, die unter industriell prozess-relevanten Bedingungen funktional sind, ist diese Technologie noch nicht implementiert. [FeFe]-Hydrogenasen, eine Klasse hochaktiver und skalierbarer  $H_2$ -oxidierender Enzyme, sind vielversprechende Kandidaten um  $H_2$  als Elektronendonator für die Synthese zu nutzen, aber aufgrund ihrer hohen  $O_2$ -Empfindlichkeit sind sie zu instabil für eine technische Anwendung. In SynHydro<sup>3</sup> werden neuartige biohybride katalytische Mikrodisk aus einem Redox-Hydrogel zur stabilen und funktionalen Integration hoch-aktiver und  $O_2$ -sensitiver [FeFe]-Hydrogenasen entwickelt. Die skalierbaren Biokatalysatoren werden so stabilisiert und vor oxidativer Schädigung geschützt und damit für  $H_2$ -getriebene Enzymkaskaden zugänglich gemacht. Das Design des Hybridsystems soll die Handhabung, Lagerung und Nutzung der [FeFe]-Hydrogenasen unter Luft und für katalytische Prozesse, die  $O_2$  als Co-Substrat benötigen, ermöglichen. Ziel ist eine skalierbare Produktion von Redox-Hydrogel-Beads, die alle für die Cofaktor-Regenerierung erforderlichen Enzyme enthalten, um  $O_2$ -abhängige Enzymkaskaden mit  $H_2$  als Elektronenquelle zu betreiben. Biohybride Materialien, die sich frei im Reaktionsmedium bewegen können, sind für Bulk-Anwendungen prädestiniert. Dies unterscheidet sie von bspw. bioelektrokatalytischen Verfahren, bei denen die Elektronen über Elektroden zugeführt werden und die Enzyme auf der Elektrodenoberfläche fixiert sind. Dieses recyclebare Biohybrid-System wird als kompatible Plattformtechnologie unter Nutzung bestehender Bioreaktorinfrastruktur dienen und als solche die Dekarbonisierung biokatalytischer Prozesse ermöglichen, indem klassische kohlenstoffreiche Elektronendonoren durch Wasserstoff ersetzt werden.

## **2. Ablauf des Vorhabens**

Das Vorhaben wurde im Zeitraum Oktober 2021 bis Dezember 2024 (39 Monate) durchgeführt. Aufgrund von Einschränkungen durch die Covid19-Pandemie haben sich leichte Verzögerungen in der Erreichung der Gesamtziele im Projekt ergeben. Aus diesem Grund haben alle Projektpartner eine kostenneutrale Verlängerung um 3 Monate von Oktober bis Dezember 2024 beantragt, um die ausstehenden praktischen Arbeiten abzuschließen, sowie den regelmäßigen Austausch mit den Projektpartnern in der letzten Phase, bei der viele Arbeiten zusammenlaufen, gewährleisten zu können. Regelmäßig wurden Projekttreffen bzw. Onlinemeetings der Projektpartner durchgeführt. Es erfolgte ein reger Austausch zum Stand der Arbeiten und zum weiteren Vorgehen per E-Mail oder durch Telefonate.

Ziel von SynHydro<sup>3</sup> ist die Etablierung einer einzigartigen Biohybridmaterial-Plattform für die nachhaltige Synthese. Diese katalytisch aktiven Biohybridmaterialien werden durch technischen Wasserstoff aus erneuerbaren Quellen (Ersatz kohlenstoffreicher Elektronendonoren) angetrieben und zur nachhaltigen Synthese von Fein- und Spezialchemikalien im industriellen Maßstab genutzt. Die erforderlichen  $H_2$ -oxidierenden Biokatalysatoren sind für den Einsatz von  $H_2$  als Reduktionsmittel nicht mit industriellen biokatalytischen Prozessen in ausreichenden Mengen verfügbar, kompatibel und einsetzbar. Eine Klasse von [FeFe]-Hydrogenasen erfüllt viele Anforderungen, leidet jedoch unter hoher  $O_2$ -Sensitivität, was ihre Anwendung einschränkt. Im Projekt SynHydro<sup>3</sup> werden diese Hydrogenasen in redoxaktive Hydrogele eingebettet, um sie vor Sauerstoff zu schützen und ihren Einsatz in  $H_2$ -getriebenen chemischen Synthesen zu ermöglichen. SynHydro<sup>3</sup> zielt darauf ab, miniaturisierte Biohybrid-Systeme für die Implementierung einer Enzymkaskade aus [FeFe]-Hydrogenasen, NAD(P)H-regenerierenden Enzymen und NAD(P)H-abhängigen Enzymen in Redox-Hydrogel-Kompartimenten zu entwickeln. Die Hydrogel-Matrix besteht aus Redox-Polymeren oder Redox-Dendrimern, je nach notwendigem pH-Wert, und hat zur Aufgabe, die Enzymkaskade zu immobilisieren. Dabei kommt bei der Entwicklung speziell der Nutzung hochaktiver Enzyme, dem optimalen Massentransport, dem effizienten Ladungstransfer und einer langen Lebensdauer der

funktionalen Biohydridmaterialien ein besonderes Augenmerk zu. Das Kern des SynHydro<sup>3</sup>-Konzeptes ist es, gleichzeitig O<sub>2</sub>-sensitive und O<sub>2</sub>-abhängige Biokatalysatoren in der Synthese von Fein- und Bulkchemikalien einsetzen zu können.

### 3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Arbeitspaket	Ziele	Ergebnis
<b>AP0</b>	Projektkoordination, IP-Strategie, Verwertungsplan	Regelmäßige Abstimmung und Präsentation der Ergebnisse bei Projekttreffen mit allen Partnern und in zweiwöchigen Arbeitsmeetings mit TUM-EBT. Weiterhin erfolgte die Zwischenberichtserstellung, sowie die Verfassung des Entwurfes zur Patenteinreichung. Die Verwertung der Ergebnisse wurde zudem fokussiert, indem bereits Folgeprojekte erfolgreich akquiriert werden konnten.
<b>AP1</b>	Produktion von Enzymen und redoxaktiven Polymeren und Dendrimeren	Im Rahmen von AP1 erfolgte die Auswahl, Herstellung und Reinigung der notwendigen Enzyme für die Beadherstellung. Zur NADPH-Cofaktorregenerierung steht eine breite Toolbox an FNR-Enzymen zur Verfügung. Die Beadherstellung erfolgte bisher aber mit dem etablierten ssFNR. Abhängig von den der Kinetik der weiteren eingesetzten Enzyme für die Produktherstellung stehen aber weitere FNRs zur Verfügung. Zur NADH Regenerierung wurden zwei Enzyme gefunden, die in Lösung eine Aktivität zeigen, jedoch konnten diese noch nicht erfolgreich aktiv im Redoxpolymer immobilisiert werden. Dieses Thema wird auch in den Folgeprojekten weiter untersucht. Für das Proof of Concept der Co-Immobilisierung aller Enzyme im Redoxpolymer und Produktherstellung unter Antrieb von Wasserstoff wurden erfolgreich Enzyme ausgewählt.
<b>AP2</b>	Elektrochemie für die Entwicklung und Optimierung des biohybriden katalytischen Systems an der Elektrode	Zunächst wurde die Enzyme an der Elektrode mittels der Redoxpolymere immobilisiert und elektroanalytisch untersucht. So konnten auch Enzym-Verhältnisse (zunächst für Hydrogenase und FNR) und weitere Parameter optimiert werden. Dies diente als Grundlage für die Herstellung der frei beweglichen Beads. Zusätzlich wurde eine GC-MS Methode entwickelt zur Bestimmung der Umsätze in den Proof of Concept Versuchen.
<b>AP3</b>	Frei bewegliche biohybride katalytische Mikrodisk	Zur Identifikation eines geeigneten Enzyms zur Verwendung für das Proof of Concept der SynHydro <sup>3</sup> Technologie wurden verschiedene Enzyme getestet. Die Enzyme wurden hergestellt, gereinigt und zunächst im Polymer immobilisiert und unter Zugabe von NADPH Umsätze beobachtet. Das geeignetste Enzym wurde anschließend für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt. Schrittweise wurden die FNR und Hydrogenase co-immobilisiert und erfolgreich eine Produktbildung unter Verwendung von Wasserstoff demonstriert. Ein Parameterscreening gibt erste Hinweise, wie die Umsätze dabei weiter optimiert werden können.
<b>AP4</b>	Katalyse mit biohybriden Mikrodisk in einem Reaktor im Liter-Maßstab	Parallel zum Parameterscreening wurde für einen ersten Skalierungsversuch auch eine größere Menge an Beads (200 Stück) hergestellt, um den Übertrag in den von ESy Labs konzipierten Reaktor zu prüfen.

**Sachbericht zum Verwendungsnachweis – Teil II**

**30.06.2025**

**ZE:**

Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB  
Bio-, Elektro- und Chemokatalyse BioCat  
Schulgasse 11 a  
94315 Straubing

**FKZ:**

031B1123B

**Vorhabenbezeichnung:**

IBZT-01: SynHydro<sup>3</sup> – Syntheseplattform unter Verwendung von Wasserstoff, Hydrogenasen und Hydrogelen  
(Teilprojekt B)

**Laufzeit des Vorhabens:**

01.10.2021 - 31.12.2024

**Berichtszeitraum:**

01.10.2021 - 31.12.2024

**Unterschrift des Projektleiters des Zuwendungsempfängers**

Straubing, den 30.06.2025

\_\_\_\_\_  
Dr. Melanie Iwanow

## 1. Ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

### 1.1. Planung des Vorhabens

Das Vorhaben wurde im Zeitraum Oktober 2021 bis Dezember 2024 (39 Monate) durchgeführt. Aufgrund von Einschränkungen durch die Covid19-Pandemie haben sich leichte Verzögerungen in der Erreichung der Gesamtziele im Projekt ergeben. Aus diesem Grund haben alle Projektpartner eine kostenneutrale Verlängerung um 3 Monate von Oktober bis Dezember 2024 beantragt, um die ausstehenden praktischen Arbeiten abzuschließen, sowie den regelmäßigen Austausch mit den Projektpartnern in der letzten Phase, bei der viele Arbeiten zusammenlaufen, gewährleisten zu können. Regelmäßig wurden Projekttreffen bzw. Onlinemeetings der Projektpartner durchgeführt. Es erfolgte ein reger Austausch zum Stand der Arbeiten und zum weiteren Vorgehen per E-Mail oder durch Telefonate.

Ziel von SynHydro<sup>3</sup> ist die Etablierung einer einzigartigen Biohybridmaterial-Plattform für die nachhaltige Synthese. Diese katalytisch aktiven Biohybridmaterialien werden durch technischen Wasserstoff aus erneuerbaren Quellen, der als Elektronendonator dient, angetrieben und zur nachhaltigen Synthese von Fein- und Spezialchemikalien im industriellen Maßstab genutzt. Diese Technologie ist bisher nicht verfügbar. Die erforderlichen H<sub>2</sub>-oxidierenden Biokatalysatoren sind für den Einsatz von H<sub>2</sub> als Reduktionsmittel nicht mit industriellen biokatalytischen Prozessen in ausreichenden Mengen verfügbar, kompatibel und einsetzbar. Eine besondere Klasse an natürlich vorkommenden H<sub>2</sub>-oxidierenden Katalysatoren aus der Klasse der [FeFe]-Hydrogenasen erfüllt viele der benötigten Anforderungen. Ihre hohe O<sub>2</sub>-Sensitivität schränkt ihre praktische Anwendung jedoch gegenwärtig stark ein. In SynHydro<sup>3</sup> werden die [FeFe]-Hydrogenasen in speziell entwickelte redoxaktive Hydrogele eingebettet, um sie vor Sauerstoff zu schützen und deren Einsatz in der H<sub>2</sub>-getriebenen chemischen Synthese im industriellen Maßstab zu ermöglichen. Die [FeFe]-Hydrogenasen nutzen Wasserstoff als atomökonomisches und speicherbares Reduktionsmittel (Elektronendonator) und ersetzen kohlenstoffreiche (nicht sehr atomökonomische) Elektronendonoren. Die SynHydro<sup>3</sup>-Technologie umfasst also innovative Biohybrid-Systeme, die einen einzigartigen Mehrwert in Bezug auf Skalierbarkeit, Robustheit, Katalysatorausnutzung und Universalität der Anwendungen aufweisen. Daneben sind sie aufgrund ihres modularen Aufbaus für spezifische Anwendungen leicht weiterzuentwickeln. Um die Technologie zu implementieren zielt SynHydro<sup>3</sup> darauf ab, miniaturisierte Biohybrid-Systeme für die Implementierung einer Enzymkaskade aus [FeFe]-Hydrogenasen, NAD(P)H-regenerierenden Enzymen und NAD(P)H-abhängigen Enzymen in Redox-Hydrogel-Kompartimenten zu entwickeln. Die Hydrogel-Matrix besteht aus Redox-Polymeren oder Redox-Dendrimeren, je nach notwendigem pH-Wert, und hat zur Aufgabe, die Enzymkaskade zu immobilisieren. Dabei kommt bei der Entwicklung speziell der Nutzung hochaktiver Enzyme, dem optimalen Massentransport, dem effizienten Ladungstransfer und einer langen Lebensdauer der funktionalen Biohybridmaterialien ein besonderes Augenmerk zu. Das Kern des SynHydro<sup>3</sup>-Konzeptes ist es, gleichzeitig O<sub>2</sub>-sensitive und O<sub>2</sub>-abhängige Biokatalysatoren in der Synthese von Fein- und Bulkchemikalien einsetzen zu können.

Das SynHydro<sup>3</sup>-Konsortium hat bereits in verschiedenen Teilen des Teams zusammengearbeitet und verfügt über die erforderliche komplementäre Expertise, um die Projektziele erfolgreich anzugehen.

Die Arbeitsplanung war in 4 Arbeitspakete unterteilt:

- **AP0: Projektkoordination, IP-Strategie, Verwertungsplan**  
Ziel: Projektmanagement, Organisation und Teilnahme an Projekttreffen, Berichterstellung, Patenteinreichung und Verwertung
- **AP1: Produktion von Enzymen und redoxaktiven Polymeren und Dendrimeren**  
Ziel: Auswahl, Herstellung und Optimierung aller notwendigen Enzyme und Redox-Polymere/-Dendrimere als Ausgangsstoffe für die Biohybridmaterialien

- **AP2: Elektrochemie für die Entwicklung und Optimierung des biohybriden katalytischen Systems an der Elektrode**  
Ziel: Entwicklung, Optimierung und Charakterisierung der katalytisch aktiven Biohybridmaterialien, die zunächst auf einer Elektrode gecoated untersucht werden
- **AP3: Frei bewegliche biohybride katalytische Mikrodisk**  
Ziel: Herstellung entkoppelter Enzym-Polymer-Filme zur Untersuchung als frei bewegliche Mikrodisk in bestehenden Systemen (anaerobe und aerobe Enzymkaskade)
- **AP4: Katalyse mit biohybriden Mikrodisk in einem Reaktor im Liter-Maßstab**  
Ziel: Skalierung in einen Reaktor im Liter-Maßstab und Kopplung mit technischen Wasserstoffströmen nach Optimierung der Herstellung der frei beweglichen biohybriden Hydrogel-Mikrodisk und Etablierung der Anwendung in anaeroben und aeroben Modellreaktionen im kleinen Maßstab

## 1.2. Wissenschaftlicher Stand zu Beginn des Projektes

Eine Vielzahl enzymatischer Reduktionsreaktionen ist auf den Cofaktor NAD(P)H als Reduktionsmittel angewiesen.<sup>1</sup> Die Regeneration des Cofaktors ist ein entscheidender Schritt für den robusten Einsatz von NAD(P)H-abhängigen Enzymen. Diese NAD(P)H-Cofaktoren sind teuer und schwer zu synthetisieren oder zu reinigen, was ihren Einsatz in industriellen Prozessen wirtschaftlich unrentabel macht, sofern sie nicht recycelt werden können. Die Regeneration dieser Cofaktoren in der großtechnischen Biokatalyse erfordert eine hohe Aktivität und Selektivität, sollte nur wenige Abfälle und Nebenprodukte erzeugen und gegenüber einem breiten Spektrum von Reaktionsbedingungen tolerant sein.<sup>2,3</sup>

Verschiedene Methoden zur Regeneration von Cofaktoren wurden vorgeschlagen: enzymatische (gekoppeltes Substrat, z. B. Isopropanol, oder gekoppeltes Enzym, z. B. Glucose- oder Formiat-Dehydrogenasen), chemische (z. B. Natriumdithionit, Natriumborhydrid), elektrochemische (direkt an der Elektrode oder indirekt unter Verwendung organometallischer Komplexe als Wasserstoffübertragungsmittel), photokatalytische (z. B. Kohlenstoffnitrid als Photokatalysator), homogene (z. B. Rh-, Ru- oder Ir-Komplexe) und heterogen katalytische (z. B. Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Ansätze.<sup>2-6</sup> Enzymatische Regenerationssysteme sind derzeit auf industrieller Ebene Stand der Technik, wobei z. B. Formiat- oder Glucosedehydrogenasen zum Einsatz kommen.<sup>2</sup> Allerdings werden bei diesem Prozess kohlenstoffreiche Chemikalien verbraucht und unerwünschte Nebenprodukte entstehen.<sup>2,7</sup> Daher sind die Atomökonomie und die Nachhaltigkeit der gesamten Reaktion nicht günstig, und Systeme, bei denen nur H<sub>2</sub> als Reduktionsmittel dienen würde, wären eine ideale Lösung. Die wasserstoffgetriebene Regeneration von Cofaktoren könnte kohlenstoffhaltige Elektronendonatoren wie Alkohole und Zucker in der Biotechnologie ersetzen, um die hohen Kosten, die Bildung von Nebenprodukten und die CO<sub>2</sub>-Emissionen zu vermeiden, die mit der Herstellung und Verwendung dieser Elektronendonatoren verbunden sind.<sup>8</sup>

Edelmetalle wie Platin (Pt) sind zwar ausgezeichnete Katalysatoren für die Wasserstoffoxidation, aufgrund ihrer Seltenheit und ihrer hohen Kosten sind jedoch alternative Katalysatoren mit gleichwertigen Eigenschaften wünschenswert. Darüber hinaus wird Pt durch CO und H<sub>2</sub>S irreversibel inaktiviert, beides häufige Verunreinigungen von technischem Wasserstoff, der aus industriellen Prozessen gewonnen wird.<sup>9,10</sup> Wie oben erwähnt, weisen Hydrogenasen ähnliche Raten für die Umwandlung von Wasserstoff zu Pt auf aktiver Basis auf,<sup>11</sup> werden jedoch nur reversibel durch CO<sup>12,13</sup> und H<sub>2</sub>S<sup>14,15</sup> inhibiert. Spuren dieser Gase (<1 %) dürften die Effizienz unseres Biohybridsystems nicht beeinträchtigen, was einen wesentlichen Vorteil von Hydrogenasen gegenüber Pt darstellt. Für diese Anwendung stehen verschiedene Arten von Hydrogenasen zur Verfügung. [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen sind die beiden Hauptklassen, innerhalb jeder dieser Klassen gibt es zahlreiche Unterklassen, von denen einige anwendbar sind, andere hingegen nicht. Die O<sub>2</sub>-tolerante Unterklasse

der [NiFe]-Hydrogenasen ist grundsätzlich vielversprechend, da biotechnologische Prozesse vorzugsweise unter aeroben Bedingungen durchgeführt werden oder sogar O<sub>2</sub> als Reaktant benötigen.<sup>16,17</sup> Die Möglichkeit, Katalysatoren in Luft zu betreiben, erleichtert daher deren Einsatz erheblich. Trotz überzeugender Proof-of-Concept-Demonstrationen ist die industrielle Hochskalierung der [NiFe]-Hydrogenase jedoch schwierig, da die Proteinausbeute derzeit auf weniger als 1 mg pro Liter Zellkultur begrenzt ist und die Synthese der NiFe-Stelle von zahlreichen zusätzlichen Enzymen abhängt.<sup>18-20</sup> Derzeit gibt es keine Lösung, um die Hochskalierung dieses komplexen Metalloenzym zu ermöglichen.<sup>17, 21-26</sup> Die [FeFe]-Hydrogenasen sind hochaktiv und skalierbar, aber ihre Sauerstoffempfindlichkeit stellt eine große Herausforderung dar und hat ihre Verwendung in biokatalytischen Prozessen bisher verhindert.

### 1.3. Durchführung und wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens

Das Fraunhofer IGB, Institutsteil Straubing hat im Projektverlauf die Arbeitspakete 1.2 (Ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup>-Reduktasen (FNR) und anaerobe Enzymkaskade), 2.3 (Elektrochemische und biochemische Charakterisierung des biohybriden katalytischen Systems), 2.4 (Entwicklung einer HPLC-MS Analytik), 3.2 (Anwendung der Hydrogel-Mikrodisks: anaerobe Enzymkaskade) und 4.2 (Test eines wässrig-organischen Zweiphasensystems) bearbeitet.

In SynHydro<sup>3</sup> wurden verschiedene neue FNRs identifiziert und hergestellt, um die bestehende Toolbox zu erweitern. Dabei wurden zunächst 5 FNRs (FNR21 - 25) aus halophilen und thermophilen Stämmen (Archaeen) ausgewählt.

Ein wichtiges Ziel bei der Herstellung ist eine ausreichend hohe Ausbeute an löslichem Protein pro g mikrobieller Biomasse, um hinsichtlich einer industriellen Anwendung eine effiziente Enzymproduktion zu gewährleisten. Da bei ersten Versuchen im Vektor pET28a nur FNR21, 22 und 25 in geringen Konzentrationen löslich hergestellt und über His-Tag aufgereinigt werden konnten, wurden FNR21 - 25 in den Vektor pGEX-4T-1 umkloniert. Die erhaltenen rekombinanten Fusionsproteine tragen dann nach Gen-Expression einen GST-Tag. Der GST-Tag ist ein Protein, das sich während der Translation schnell in ein stabiles und leicht lösliches Protein faltet und so die Löslichkeit und Faltung des gesamten Fusionsproteins unterstützen soll. Die Klonierung und Sequenzierung von FNR21 - 25 war erfolgreich und Expressionstests konnten durchgeführt werden. Im Anschluss konnten die pGEX-4T-1 FNR21 - 25 Enzyme hergestellt und gereinigt werden.

Die Kinetik der hergestellten pGEX-4T-1 FNR21 - 25 Proteine wurde anschließend mit der *in House* etablierten Methode in Lösung unter Verwendung von NADP<sup>+</sup> gemessen und berechnet. Im Vergleich zur Negativkontrolle ohne FNR zeigt sich, dass FNR21 und 23 nicht aktiv sind, während bei FNR22, 24 und 25 eine geringe Aktivität festgestellt werden kann. Eine Verbesserung der Aktivität im Vergleich zu den bereits hergestellten und *in House* verfügbaren FNRs 1 - 20 konnte jedoch nicht gezeigt werden. Neben der bioelektrochemischen Regenerierung des Cofaktors NADPH wurde auch NADH fokussiert, um die SynHydro<sup>3</sup>- Biohybridmaterialien später möglichst breit anwenden zu können. Dazu wurden die bereits existierenden FNRs (bereits mit NADP<sup>+</sup> getestet) auch mittels der Kinetikmethode in Lösung mit NAD<sup>+</sup> charakterisiert. Basierend auf den gemessenen Daten, die keine oder nur sehr geringe Aktivität hinsichtlich NADH Regenerierung zeigen, war es notwendig neue Enzyme zu recherchieren. Hierzu wurden literaturbekannte Enzyme ausgewählt, die sich somit leicht herstellen lassen sollten. Mit Hilfe von Expressionstests konnten lösliche Mengen an FNR 26 - 30 hergestellt werden.

Diese neuen FNRs wurden ebenfalls mittels der Kinetikmethode in Lösung und mit NAD<sup>+</sup> charakterisiert. Überraschenderweise zeigen auch die neuen literaturbekannten Enzyme keine oder nur eine leichte Aktivität hinsichtlich der NADH Regenerierung. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden einige Optimierungen versucht. Während die Umklonierung von FNR28 in den Vektor pET22b die Expression deutlich verbessert hat und auch die Kinetikwerte im Vergleich noch die besten Ergebnisse geliefert haben, hat die Umklonierung bei FNR26 und FNR27 weder bei der Expression noch bei der Kinetik-Messung zu einer Verbesserung geführt. Um auszuschließen, dass das Fehlen von FAD als Cofaktor für die geringen Aktivitäten der rekombinanten FNRs verantwortlich ist, wurde zusätzlich eine Beladung mit FAD nach der Expression untersucht. Aufgrund der hohen Enzymausbeuten in der

rekombinanten Expression wurde FNR29 für diese Beladungsversuche ausgewählt, jedoch konnte die Aktivität auch durch die nachträgliche FAD-Beladung nicht gesteigert werden. Zusammenfassend haben somit alle FNRs keine oder nur eine geringe Aktivität hinsichtlich der NADH Regenerierung gezeigt. Auch verschiedene Optimierungsmethoden hatten keine Verbesserung gezeigt. Die Kinetik-Messungen in Lösung ermöglichen es, die Aktivität der FNRs untereinander zu vergleichen und einzuschätzen, ob die Enzyme generell aktiv sind, können aber keine Aussage liefern, wie gut die Performance der Enzyme dann immobilisiert in den Hydrogelen ist.

Exemplarisch wurden somit die in pET28a ssFNR, pET22b FNR26 und pET28a FNR29 codierten Enzyme hergestellt, in einem geeigneten redoxaktiven Polymer immobilisiert und die Aktivität hinsichtlich NADH-Recycling mit Hilfe einer Chronoamperometrie-Messmethode untersucht.

ssFNR, obwohl die Kinetikmesswerte ähnlich schlechte Ergebnisse im Vergleich mit den anderen FNRs zeigen, hat in diesem Versuch eine Aktivität gezeigt und kann somit zur NADH Regenerierung eingesetzt werden. Dies bestätigt auch die elektroanalytische Untersuchung mittels Cyclovoltammetrie und eine Chronoamperometrie-Messung mit anschließender UV/VIS-Bestimmung des Cofactors NADH.

FNR28 zeigte von den fünf neuen FNRs (FNR26 - 30) zunächst noch die besten Kinetikwerte und wurde somit noch genauer untersucht. Mittels photometrischer Messung wurde die NADH-Oxidation untersucht, um erste Hinweise mittels einfacher Experimente zu erhalten, ob das Substrat NADH generell erkannt wird. Hier zeigt FNR28 in Lösung eine Aktivität und der Cofaktor NADH nimmt über die Zeit ab.

FNR28 zeigt jedoch bisher keine Aktivität, wenn es in Redoxpolymeren immobilisiert ist. Dabei wurden verschiedene Polymere mit unterschiedlichen Potentialen und sowohl NADH-Oxidation als auch NAD<sup>+</sup>-Reduktion untersucht.

Somit wurden weitere Enzyme untersucht, um die NADH-Regenerierung zu verbessern. Dazu wurden Diaphorasen für weitere Testungen ausgewählt. FNR31 ist eine literaturbekannte NADH-regenerierende Diaphorase und das Plasmid zur Herstellung von FNR32 sowie 33 wurde vom Projektpartner TUM-CBR erhalten. Um die Expression und Aufreinigung zu vereinfachen sowie im besten Fall die Ausbeute zu steigern, wurden die Diaphorase-Gene zunächst in pET28a erfolgreich kloniert (FNR32).

Nach erfolgreicher Klonierung, wurde ein Expressionstest in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt unter Variation verschiedener Bedingungen (Medium, Zeit, IPTG-Konzentration, Temperatur). Bei der Expression einer größeren Menge konnte jedoch kaum lösliches Protein produziert und aufgereinigt werden. Die elektrochemische Kinetik-Messung hat keine bzw. nur sehr schlechte Aktivität von FNR32 hinsichtlich NADH Regenerierung gezeigt. Zur Optimierung der Enzymausbeute und einer erneuten Kinetik-Messung wurde ein weiteres Zellpellet unter den oben angegebenen Bedingungen hergestellt und verschiedene Aufschlussmethoden (French-Press, chemischer Zellaufschluss mit CellLytic, Sonotrode) und Aufreinigungsmethoden (FPLC, Inclusion Body Aufreinigung) gescreent. Alle Methoden haben kaum Einfluss auf die Ausbeute an löslichem Enzym gezeigt. Aus diesem Grund wurden die Expressionsbedingungen noch einmal variiert und das Zellpellet mittels French-Press aufgeschlossen. Diese Methode führte zu einer gesteigerten Ausbeute an löslichem Enzym. Die Kinetik-Messung hat jedoch erneut bestätigt, dass das neu hergestellte FNR32 keine Aktivität hinsichtlich NADH Regeneration aufweist. Um sicherzustellen, dass das Enzym FNR32 ebenfalls nicht aktiv ist, wenn es im Redoxpolymer immobilisiert ist, wurde FNR32 im Polymer auf einer Elektrode immobilisiert. Im Anschluss wurden Cyclovoltammetrie (CV) Messungen, sowie eine Chronoamperometrie-Messung durchgeführt mit anschließender UV/VIS-Messung. Es konnte jedoch weder ein Anstieg des katalytischen Stroms in den CV-Messungen noch eine Cofaktor-Bildung in der UV/VIS-Messung beobachtet werden. Dadurch wird bestätigt, dass FNR32 gegenüber NAD<sup>+</sup> nicht aktiv ist.

Als weiterer Ansatz, genug lösliches und aktives Enzym zu erhalten, wurde FNR32 in einen anderen Vektor - pACY – kloniert (FNR33). Zunächst wurden bekannte Expressionsbedingungen eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mittels FPLC und einer Strep-Tactin Säule. Jedoch konnte kein Enzym

aufgereinigt werden, da die Untereinheit an dem der Strep-Tag gebunden ist, nicht exprimiert wurde. Somit wurden Expressionstests durchgeführt. Bei den besten Expressionsbedingungen konnten beide Untereinheiten löslich exprimiert und aufgereinigt werden. Die elektrochemische Kinetik-Messung hat ebenfalls sehr vielsprechende Ergebnisse geliefert mit dem bisher höchsten  $k_{cat}$ -Wert für die NADH Regeneration.

Um die Aktivität zu bestätigen, wurde das FNR33 Enzym in Lösung getestet. Hierzu wurde eine spektroskopische Methode zur einfacheren Beurteilung der hergestellten FNRs im Vergleich zur elektrochemischen Methode entwickelt. Hierbei dient ein Viologen-basierter Redoxmediator mit einem positiven Redoxpotential gegen NAD(P)/NAD(P)H als Elektronenvermittler zwischen dem Enzym und  $O_2$ , das als endgültiger Elektronenakzeptor fungiert. Der Verbrauch von NAD(P)H kann spektroskopisch bei 340 nm verfolgt werden, was auf die Aktivität des Enzyms hinweist. Eine Aktivität bei dieser Methode ist aber keine Garantie, dass das Enzym auch nach Immobilisierung in den Redoxpolymeren aktiv ist, da hier die Oxidationsreaktion durchgeführt wird und später die NAD(P)<sup>+</sup>-Reduktion von Interesse ist. Dennoch kann so mit wenig Aufwand überprüft werden, ob das Enzym generell NAD(P)H als Substrat erkennt. Mittels dieser spektroskopischen Methode konnte für FNR33 eine Aktivität gegenüber NADH nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt wird FNR33 in einem geeigneten Redoxpolymer immobilisiert und untersucht, ob das Enzym aktiv ist. Nach Immobilisierung von FNR33 in diesem Polymer zeigt die Elektroanalytik keine Aktivität des Enzyms. Anschließend wurden weitere verschiedene Polymere aus der vorhandenen Toolbox von TUM-EBT gescreent, jedoch konnte das Enzym bisher nicht erfolgreich aktiv immobilisiert werden.

#### Anaerobe Enzymkaskade

Ein geeignetes Redox-Polymer und ein Redox-Dendrimer mit unterschiedlichen Redox-Potenzialen wurden so modifiziert, um die Vernetzung zur Bildung von Hydrogel-Beads zu induzieren. Die Redox-Hydrogelbeads fungieren als Immobilisierungsmatrix für die Redox-Enzyme und vermitteln den Elektronentransfer zwischen ihnen. Um zu zeigen, dass jedes Material in der Lage ist, Elektronen zwischen Hydrogenase und FNR zu übertragen, wurden die katalytischen Ströme für die  $H_2$ -Oxidation und die NADP<sup>+</sup>-Reduktion mittels Cyclovoltammetrie gemessen. In jedem Fall werden beide Redoxprozesse erfolgreich durchgeführt. Die Beads wurden durch Dropcasting einer Mischung aus Polymer und Enzymen hergestellt. Wenn sowohl Hydrogenase als auch FNR gemeinsam in den Polymerbeads immobilisiert sind, kann die kontinuierliche Bildung des reduzierten Cofaktors NADPH, während gasförmiger Wasserstoff in einer gepufferten Lösung mit NADP<sup>+</sup> und den Beads zugeführt wurde, beobachtet werden.

Nachdem die potenzielle Anwendung des synthetisierten Redoxpolymers und Dendrimers bei der Immobilisierung von Enzymen, der Beadbildung und dem Elektronentransfer zwischen Hydrogenase und FNR nachgewiesen werden konnten, wurden die Filme hinsichtlich des Polymer/Enzym-Verhältnisses und der Filmdicke optimiert, um die höchstmöglichen Stromdichten zu erreichen, wobei zunächst die Bedingungen für den höchsten  $O_2$ -Schutz angestrebt wurden. Die Filmbedingungen wurden mit Hilfe von Cyclovoltammetrie und Chronoamperometrie optimiert.

Die optimierten Bedingungen an den Elektroden werden dann auf die frei diffundierenden Beads übertragen und mit weiteren Enzymen für verschiedene Anwendungsbeispiele gekoppelt.

Es wurden Redoxpolymer-Beads hergestellt, in denen alle eingesetzten Enzyme co-immobilisiert sind und die Reaktion mittels Wasserstoff angetrieben. Nach 24 h konnte mittels GC-MS eine Produktbildung nachgewiesen werden, während die Negativkontrollen keinen Umsatz zeigen, wodurch das Proof of Concept der SynHydro<sup>3</sup>-Technologie gezeigt werden konnte. Im nächsten Schritt wurden verschiedenste Parameter variiert und optimiert, um den Produktumsatz zu verbessern. Zur Auswertung des Parameter-Screenings wurde eine geeignete GC-MS-Methode und entsprechende Kalibriergeraden für das Edukt und Produkt entwickelt. Da die Stabilität der Enzym-Polymer-Beads entscheidend für eine vergleichende Auswertung der verschiedenen Parameter hinsichtlich Beadherstellung und Reaktionsdurchführung ist, wurden hier erst einige Untersuchungen

durchgeführt, um gleichbleibend stabile Beads zu erhalten.

Zusammenfassend hat das anschließend durchgeführte Screening ergeben, dass Umsätze zum Produkt über 80 % erreicht werden. Geplant ist es diese Messreihe noch einmal zu wiederholen. Es konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass eine Co-Immobilisierung aller Enzyme in den Redoxpolymeren möglich ist und eine fast vollständige Produktbildung in kurzer Zeit erreicht wird.

Parallel zum Parameterscreening wurde für einen ersten Skalierungsversuch auch eine größere Menge an Beads (200 Stück) hergestellt, um den Übertrag in den von ESy Labs konzipierten Reaktor zu prüfen.

## **2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Die Position 0838 (Reisekosten) wurde verwendet für die Reisekosten zum Statusmeeting in Berlin im Oktober 2023 und für eine Fahrt zur Firma ESy Labs, um einen gemeinsamen Skalierungs-Versuch durchzuführen. Die meisten Projekttreffen wurden aufgrund der Corona-Pandemie zunächst online durchgeführt. Sobald persönliche Treffen wieder möglich waren, fanden diese in Straubing statt, somit sind keine Reisekosten entstanden. Die Investitionsmittel konnten wie geplant für die Anschaffung einer FPLC verwendet werden. Diese Anschaffung wurde direkt zu Projektbeginn in die Wege geleitet und dann auch im Laufe des Projekts für die Aufreinigung der verwendeten Enzyme regelmäßig eingesetzt.

Die restlichen Positionen wurden ebenfalls wie geplant verwendet.

## **3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten**

Im Rahmen von SynHydro<sup>3</sup> wurden komplett neue Innovationen erschlossen und die Realisierung der biohybriden Materialien wird eine einzigartige synthetische Plattform bieten, die für verschiedene Märkte diversifiziert werden kann. Die einfache und modulare Architektur des Materials und seine Funktion stellen zusammen eine Verkörperung der nachhaltigen Chemie für die Zukunft dar und kombinieren Energiespeicherung, wasserstoffgetriebene Biokatalyse, Wiederverwendbarkeit und sollen schnell skalierbar sein.

Obwohl das Anwendungspotential hoch ist und einzelne Module bereits etabliert sind, waren vielfältige Arbeiten notwendig, um den Übergang in die Anwendung in der Biokatalyse erfolgreich zu meistern. Durch die ausgewählten Strategien zur Realisierung der biohybriden Materialien für die chemische Synthese, wodurch einzigartige Eigenschaften der Polymerwissenschaften, der Biokatalyse und der Elektrochemie kombiniert wurden, konnte ein technologischer Durchbruch erreicht werden. Dieser Durchbruch wird aufgrund seiner Modularität und Skalierbarkeit von unmittelbarem Interesse für die chemische Industrie sein, ebenso wie die Tatsache, dass er auf anspruchsvolle chemische Reaktionen bei geringem Bedarf an erneuerbarer Energie abzielt. Aufgrund der Komplexität konnten die geplanten Arbeiten aber nicht von einem einzelnen Partner durchgeführt werden, sondern erfordern zwingend die Beteiligung der Experten aus den verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen. Das Projekt hatte gewisse technische Risiken, da biologische Komponenten nicht vollständig vorhersehbar sind und somit biohybride Materialien nicht unbedingt einem Engineering by Design-Ansatz folgen. Aus diesem Grund wurde das SynHydro<sup>3</sup>-Konsortium gebildet, das die gesamte Entwicklungskette abdeckt und so die notwendigen Arbeiten optimal aufteilen konnte. Das Konsortium hat verschiedene Redox-Polymere und -Dendrimere, sowie Enzyme für die Elektronenbereitstellung (Hydrogenasen), Cofaktor-Regenerierung (FNRs) und die Anwendung in der anaeroben und aeroben Kaskade hergestellt. Ein Großteil der Arbeit ist ebenfalls in die erfolgreiche und stabile Entwicklung der SynHydro<sup>3</sup>-Mikrodisk geflossen. Am Fraunhofer IGB konnten diese dann für ein ausführliches Parameterscreening in der Anwendung einer anaeroben Kaskade erfolgreich eingesetzt werden.

## **4. Voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Ziel für alle Partner ist der Schutz der beschriebenen Technologie bereits in einer frühen Phase des Projektes. Dies ist wichtig bevor erste Ergebnisse veröffentlicht werden. Die Patenteinreichung in Zusammenarbeit von der TU München und dem Fraunhofer IGB ist im Juli 2025 erfolgt. Damit stellt die Verwertung von Ergebnissen nach individuellen Lizenzvereinbarungen eine Option dar.

Ziel für die Forschungspartner war es auch, die SynHydro<sup>3</sup>-Technologie und den zunehmenden Bekanntheitsgrad zu nutzen, um weitere Projekte, Partner oder Kunden zu akquirieren und somit dann langfristig direkte Forschungsaufträge aus der Industrie zu erhalten. Die erfolgreiche Entwicklung und Erprobung der Biohybrid-Materialien stärkt die bestehende Expertise der Partner in einzigartiger Weise und sorgt für internationale Sichtbarkeit. Eine vielfältige Anzahl von Folgeprojekten ist zu erwarten: ECOMO (HORIZON-EIC-2022-PATHFINDERCHALLENGES-01, Project: 101115403) und eCO<sub>2</sub>DIS (BMBF, FKZ 031B1405) konnte bereits erfolgreich akquiriert werden und diese beiden Projekte laufen bereits. Neue weitere Projekte sind von den Partnern einzeln (BMFTR, eCO<sub>2</sub>Chem) oder von Teilen des Konsortiums gemeinsam (BMFTR, eVOBIMA) eingereicht worden. Es ist weiterhin geplant die Ergebnisse in Fachzeitschriften zu veröffentlichen (Ergebnisse der einzelnen Partner, sowie Gemeinschaftsergebnisse), nachdem die Patenteinreichung erfolgt ist.

#### **5. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Es sind während der Durchführung des Projektes keine Veröffentlichungen bekannt geworden, weder in der Fachliteratur noch auf Patentebene, die den Partnern bekannt wären und für das Vorhaben relevant wären.

#### **6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse nach Nr. 5 der NKBF**

Es sind keine Veröffentlichungen in der Projektlaufzeit erfolgt. Das Screening zur anaeroben Enzymkaskade in den SynHydro<sup>3</sup>-Beads wird aber nach Projektabschluss noch zusammengefasst und veröffentlicht.

#### **7. Literatur**

1. Devaux-Basseguy, R.; Bergel, A.; Comtat, M., Potential applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases in synthesis: A survey. *Enzyme and Microbial Technology* 1997, 20 (4), 248-258.
2. Wang, X.; Saba, T.; Yiu, H. H. P.; Howe, R. F.; Anderson, J. A.; Shi, J., Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. *Chem* 2017, 2 (5), 621-654.
3. Uppada, V.; Bhaduri, S.; Noronha, S. B., Cofactor regeneration – an important aspect of biocatalysis. *Current Science* 2014, 106 (7), 946-957.
4. Kroutil, W.; Mang, H.; Edegger, K.; Faber, K., Biocatalytic Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis* 2004, 346 (2-3), 125-142.
5. Zhang, W.; O'Connor, K.; Wang, D. I. C.; Li, Z., Bioreduction with Efficient Recycling of NADPH by Coupled Permeabilized Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 2009, 75 (3), 687-694.
6. Wu, H.; Tian, C.; Song, X.; Liu, C.; Yang, D.; Jiang, Z., Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. *Green Chemistry* 2013, 15 (7), 1773-1789.
7. Anson-Schumacher, M. B.; Steinsiek, S.; Eberhard, W.; Keramidis, N.; Erkens, K.; Hartmeier, W.; Büchs, J., Assaying CO<sub>2</sub> release for determination of formate dehydrogenase activity in entrapment matrices and aqueous-organic two-phase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 2006, 95 (1), 199-203.
8. Horch, M.; Lauterbach, L.; Lenz, O.; Hildebrandt, P.; Zebger, I., NAD(H)-coupled hydrogen cycling – structure–function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases. *FEBS Letters* 2012, 586 (5), 545-556.
9. Cheng, X.; Shi, Z.; Glass, N.; Zhang, L.; Zhang, J.; Song, D.; Liu, Z.-S.; Wang, H.; Shen, J., A review of PEM hydrogen fuel cell contamination: Impacts, mechanisms, and mitigation. *Journal of Power Sources* 2007, 165 (2), 739-756.
10. Bacquart, T.; Murugan, A.; Carré, M.; Gozlan, B.; Auprêtre, F.; Haloua, F.; Aarhaug, T. A., Probability of occurrence of ISO 14687-2 contaminants in hydrogen: Principles and examples from steam methane reforming and electrolysis (water and chlor-alkali) production processes model. *International Journal of Hydrogen Energy* 2018, 43 (26), 11872-11883.
11. Jones, A. K.; Sillery, E.; Albracht, S. P. J.; Armstrong, F. A., Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst. *Chemical Communications* 2002, (8), 866-867.
12. Purec, L.; Krasna, A. I.; Rittenberg, D., The Inhibition of Hydrogenase by Carbon Monoxide and the Reversal of this Inhibition by Light\*. *Biochemistry* 1962, 1 (2), 270-275.
13. Lemon, B. J.; Peters, J. W., Binding of Exogenously Added Carbon Monoxide at the Active Site of the Iron-Only Hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* 1999, 38 (40), 12969-12973.
14. Rodríguez-Maciá, P.; Reijerse, E. J.; van Gastel, M.; DeBeer, S.; Lubitz, W.; Rüdiger, O.; Birrell, J. A., Caught in the Hinaet: Crystal Structure and Spectroscopy Reveal a Sulfur Bound to the Active Site of an O<sub>2</sub>-stable State of [FeFe] Hydrogenase. *Angewandte Chemie International Edition* n/a (n/a).
15. Rodríguez-Maciá, P.; Reijerse, E. J.; van Gastel, M.; DeBeer, S.; Lubitz, W.; Rüdiger, O.; Birrell, J. A., Sulfide Protects [FeFe] Hydrogenases From O<sub>2</sub>. *Journal of the American Chemical Society* 2018, 140 (30), 9346-9350.
16. Lenz, O.; Lauterbach, L.; Frielingsdorf, S., Chapter Five - O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Physiology, molecular biology, purification, and biochemical analysis. In *Methods in Enzymology*, Armstrong, F., Ed. Academic Press: 2018; Vol. 613, pp 117-151.
17. Schäfer, C.; Bommer, M.; Hennig, S. E.; Jeoung, J. H.; Dobbek, H.; Lenz, O., Structure of an Actinobacterial-Type [NiFe]-Hydrogenase Reveals Insight into O<sub>2</sub>-Tolerant H<sub>2</sub> Oxidation. *Structure (London, England : 1993)* 2016, 24 (2), 285-92.

18. Lukey, M. J.; Parkin, A.; Roessler, M. M.; Murphy, B. J.; Harmer, J.; Palmer, T.; Sargent, F.; Armstrong, F. A., How Escherichia coli is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *The Journal of biological chemistry* 2010, 285 (6), 3928-38.
19. Dementin, S.; Burlat, B.; De Lacey, A. L.; Pardo, A.; Adryanczyk-Perrier, G.; Guigliarelli, B.; Fernandez, V. M.; Rousset, M., A glutamate is the essential proton transfer gate during the catalytic cycle of the [NiFe] hydrogenase. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279 (11), 10508-10513.
20. Rousset, M.; Montet, Y.; Guigliarelli, B.; Forget, N.; Asso, M.; Bertrand, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Hatchikian, E. C., [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998, 95 (20), 11625-11630.
21. Lauterbach, L.; Liu, J.; Horch, M.; Hummel, P.; Schwarze, A.; Haumann, M.; Vincent, K. A.; Lenz, O.; Zebger, I., The Hydrogenase Subcomplex of the NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe] Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* – Insights into Catalysis and Redox Interconversions. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2011, 2011 (7), 1067-1079.
22. Lauterbach, L.; Lenz, O., Catalytic Production of Hydrogen Peroxide and Water by Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase during H<sub>2</sub> Cycling in the Presence of O<sub>2</sub>. *Journal of the American Chemical Society* 2013, 135 (47), 17897-17905.
23. Ash, P. A.; Liu, J.; Coutard, N.; Heidary, N.; Horch, M.; Gudim, I.; Simler, T.; Zebger, I.; Lenz, O.; Vincent, K. A., Electrochemical and Infrared Spectroscopic Studies Provide Insight into Reactions of the NiFe Regulatory Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* with O<sub>2</sub> and CO. *The Journal of Physical Chemistry B* 2015, 119 (43), 13807-13815.
24. Löwenstein, J.; Lauterbach, L.; Teutloff, C.; Lenz, O.; Bittl, R., Active Site of the NAD<sup>+</sup>-Reducing Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* Studied by EPR Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 2015, 119 (43), 13834-13841.
25. Lauterbach, L.; Lenz, O.; Vincent, K. A., H<sub>2</sub>-driven cofactor regeneration with NAD(P)<sup>+</sup>-reducing hydrogenases. *The FEBS Journal* 2013, 280 (13), 3058-3068.
26. Abdellaoui, S.; Milton, R. D.; Quah, T.; Minteer, S. D., NAD-dependent dehydrogenase bioelectrocatalysis: the ability of a naphthoquinone redox polymer to regenerate NAD. *Chemical Communications* 2016, 52 (6), 1147-1150.
27. L. Castañeda-Losada, D. Adam, N. Paczia, D. Buesen, F. Steffler, V. Sieber, T. J. Erb, M. Richter, N. Plumeré, *Angewandte Chemie International Edition* 2021. 60 (38), 21056.