

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. März 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/018824 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P 13/14**,
19/36, 7/22 // C12N 9/04

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02775

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2002 (27.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 39 958.8 21. August 2001 (21.08.2001) DE

Troisdorf (DE). **GREINER, Lasse** [DE/DE]; Wittels-
bacherstrasse 23c, 42388 Wuppertal (DE). **VAN DEN**
BAN, Eyke [NL/NL]; Myrdalstate 30, NL-6716 NM Ede
(NL). **HAAKER, Huub** [NL/NL]; Johan Buzaiastraat 9,
NL-6708 NP Wageningen (NL).

(74) **Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM**
JÜLICH GMBH; Fachbereich Patente, 52425 Jülich
(DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** JP, US.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme**
von US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH
[DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich (DE).

Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): LIESE, Andreas**
[DE/DE]; Brockmüllerstrasse 15, 52428 Jülich (DE).
MERTENS, Rita [DE/DE]; Umlandstrasse 5, 53844

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** METHOD USED FOR THE ENZYMATIC REDUCTION OF SUBSTRATES BY MOLECULAR HYDROGEN

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN REDUKTION VON SUBSTRATEN MIT MOLEKULAREM WASSERSTOFF

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for the enzymatic reduction of substrates by molecular hydrogen, according to which a mediator is reacted with hydrogen using hydrogenase. The method is especially useful for reducing chemical mediators or cofactors of enzymes. The method is mainly utilized to reduce NADP⁺ to NADPH or to use the enzyme described in the application to regenerate the cofactor of NADPH by molecular hydrogen. The advantage of the inventive method over all the methods for regenerating NADPH so far described is the use of inexpensive molecular hydrogen for generating or regenerating the cofactor, and thereby avoiding an additional by-product to be removed. In this case, water is formed as the by-product. As a catalyst, various purifications and preparations of the enzyme *Pyrococcus furiosus* can be used.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Reduktion von Substraten mit molekularem Wasserstoff. Erfindungsgemäss wird ein Mediator mittels einer Hydrogenase mit Wasserstoff umgesetzt. Im besonderen kann dieses Verfahren angewandt werden, um chemische Mediatoren oder auch Cofactoren von Enzymen zu reduzieren. Haupteinsatzpunkt dieses Verfahrens liegt in der Reduktion von NADP⁺ zu NADPH bzw. Einsatz des im Patent beschriebenen Enzyms zur Cofaktoregenerierung von NADPH mit molekularem Wasserstoff. Vorteil dieses Verfahrens, gegenüber allen etablierten Verfahren zur Regenerierung von NADPH, liegt in der Verwendung des sehr kostengünstigen molekularen Wasserstoffs zur Generierung bzw. Regenerierung des Cofaktors und damit nicht der Bildung eines noch weiter abzutrennenden Nebenproduktes. In diesem Fall wird Wasser als Nebenprodukt gebildet. Als Katalysator Können verschiedene Aufreinigungen und Präparationen des Enzyms *Pyrococcus furiosus* eingesetzt werden.

WO 03/018824 A2

B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur enzymatischen Reduktion von Substraten
mit molekularem Wasserstoff

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Reduktion von Substraten mit molekularem Wasserstoff.

In neuerer Zeit finden immer mehr Oxidoreduktasen den Eingang in die Produktion von Feinchemikalien und Pharmazeutika. Wenn es sich hierbei um enzymatische, stereoselektive Reduktionen handelt, wird zumeist ein Cofaktor (Wasserstoffdonor) in Form von NADH oder NADPH benötigt. Da diese Cofaktoren auch heutzutage sehr hochpreisig sind, insbesondere NADPH, besteht der Bedarf für ein Verfahren, mit dem es möglich ist, NADPH im speziellen besonders preiswert zu produzieren. Des Weiteren ist vom höchsten Interesse auch ein Verfahren, welches es ermöglicht, NADPH zu regenerieren, wobei das einzelne NADPH-Molekül möglichst viele Zyklen durchlaufen können sollte (hohe total turn-over number). Letzteres ist besonders wichtig, da diese Cofaktoren deutlich zu teuer sind, um sie stöchiometrisch einzusetzen. Die derzeitige Methode der chemischen Reduktion von NADP^+ benutzt zwar kostengünstige und kommerziell erhältliche Reagenzien, wie z.B. Natriumdithionit (Peters J. Dehydrogenases - characteristics, design of reaction conditions, and applications. In: Biotechnology, biotransformations I. Kelly Dr, Editor, ed. 8a, Weinheim: Wiley-VCH, 1998. p. 391-473), jedoch sind hier insbesondere die aufwendige Produktaufarbeitung, die

Bildung von Nebenprodukten und geringe Ausbeuten die großen Nachteile (Chenault H, Whitesides G. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. Appl Biochem Biotech 1987, 14: 147-197). Die enzymatische Produktion von NADPH ist ebenfalls in verschiedenen Veröffentlichungen bereits beschrieben worden. Zum Einsatz kamen hier die Glucosedehydrogenase aus *Gluconobacter suboxydans* (Izumi Y, Nath PK, Yamamoto H, Yamada H. NADPH production from NADP⁺ with a glucose dehydrogenase system involving whole cells and immobilized cells of *Gluconobacter suboxydans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989, 30: 337-342), die Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* (Lamed RJ, Keinan E, Zeikus JG. Potential applications of an alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase from thermophilic bacteria. Enzyme Microb. Technol. 1981, 3: 144-148) und die Malatdehydrogenase aus *Acromobacter parvulus* (Suye S, Yokohama S. NADPH production from NADP⁺ using malic enzyme of *Achromobacter parvulus* IFO-13182. Enz. Microbiol. Technol. 1985, 7: 418-424). In der wissenschaftlichen Literatur findet sich ebenfalls bereits der Einsatz verschiedener Hydrogenasen: So zum Beispiel die Hydrogenase aus *Alkanigines eutrophus* (Klibanov A, Puglisi A. The regeneration of coenzymes using immobilized hydrogenase. Biotech. Lett. 1980, 2: 445-450) und die Hydrogenase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Wong C-H, Daniels L, Orme-Johnson WH, Whitesides GM. Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H regeneration using dihydrogen and the hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. J. Am. Chem. Soc. 1981, 103: 6227-6228). Alle Veröffentlichungen die bisher Hydrogenasen zum Einsatz der Cofaktorre-

generierung beschreiben, tun dieses entweder auf die direkte Reduktion von NAD^+ bezogen, oder auf die indirekte Reduktion von NADP^+ mittels eines weiteren Mediators. Die nach dem Stand der Technik eingesetzten Enzyme sind relativ labil, durchlaufen wenige Zyklen und haben für die Reaktionen eine geringe thermodynamische Triebkraft.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein einfaches Verfahren zur direkten Reduktion von Mediatoren, insbesondere von NADP^+ ohne die Benutzung eines zusätzlichen, anderen Mediators zu schaffen, welche für die Produktion von NADPH bzw. der hydrierten Form der Mediatoren und die Cofaktorregenerierung von NADPH, sowie die Regenerierung von weiteren Mediatoren eingesetzt werden kann.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst mit dem im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nunmehr möglich, Mediatoren, insbesondere NADP^+ zu hydrieren und somit zu regenerieren. Das Verfahren ist wegen des preiswerten Wasserstoffes als Agens besonders kostengünstig. Die Abtrennung des Reduktionsmittels bereitet keine Schwierigkeiten, da Wasserstoff gasförmig ist. Die erfindungsgemäß eingesetzten Enzyme sind weniger labil und durchlaufen mehr Reaktionszyklen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können quantitative Umsätze erzielt werden.

Der Prozeß kann vorzugsweise in situ durchgeführt werden.

5 Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Im Folgenden soll die Erfindung erläutert werden.

10 Erfindungsgemäß wird ein Mediator mittels einer Hydrogenase mit molekularem Wasserstoff umgesetzt.

Vorzugsweise ist die Hydrogenase aus dem hyperthermophilen Stamm des Archaeobakteriums *Pyrococcus furiosus* (DSM 3638).

15 Die Hydrogenasen können in situ eingesetzt werden.

20 Als Mediator wird erfindungsgemäß eine Substanz bezeichnet, die Hydridionen oder Elektronen auf Substanzen übertragen kann. Diese Verbindungen werden, wenn sie in Organismen natürlich vorkommen, als Cofaktoren bezeichnet. Andere Substanzen, die funktionell mit diesen natürlichen Cofaktoren gleichwirkend sind, werden als Mediatoren bezeichnet. Im Sinne der Erfindung soll
25 der Begriff Mediatoren alle bekannten Mediatoren einschließlich der natürlichen Cofaktoren bedeuten, so daß beide gleichwirkenden Arten von dem Begriff umfaßt sein sollen.

30 Beispielhaft können als Mediatoren Flavin mononukleotid (FMN), Phenazin methosulfat (PMS), 2,6 Dichlorphenolindophenol (DCPIP), Janus Grün, Methylenblau, Flavin

adenin dinukleotid(FAD) aber insbesondere NADP^+ genannt werden. NAD^+ ist jedoch von der Erfindung ausgenommen. Die Mediatoren werden erfindungsgemäß mittels der Hydrogenase in Anwesenheit von Wasserstoff in ihre reduzierte Form überführt. Die Produkte sind dem Fachmann bekannt.

Die Reaktion findet vorzugsweise in wäßrigem Medium statt.

Die Reaktion kann in einem pH-Bereich von 6-10 durchgeführt werden, findet aber vorzugsweise in einem pH-Bereich von 7 bis 9, vorzugsweise von 7,5 bis 8,5 statt, da die Enzymaktivität und die Stabilität von NADPH hier am größten ist.

Die Umsetzung kann in einem Temperaturbereich von -10°C bis 150°C , vorzugsweise in einem Bereich von 0°C bis 100°C besonders bevorzugt von 20°C bis 80°C durchgeführt werden.

Der Druckbereich, in dem die Reaktion durchgeführt werden kann liegt vorzugsweise zwischen 0 bis 300 bar, besonders bevorzugt zwischen 0 und 20 bar. In den hohen Druckbereichen > 20 bar ist die Löslichkeit von Wasserstoff höher, so daß in der Lösung mehr Moleküle für die Hydrierung zur Verfügung stehen. In den Druckbereichen unterhalb 20 bar werden Reaktoren benötigt, welche nicht so hohen Drucken standhalten können müssen, so daß der technische Aufwand hier geringer ist. Die Grenzen der angegebenen Bereiche sind jedoch fließend.

Bei den genannten Drucken kann sich die Gasphase über der Reaktionslösung verschieden zusammensetzen. Es sollte kein Sauerstoff in der Gasphase sein oder jedenfalls so wenig, daß kein explosives Gemisch vorliegt. Der Wasserstoff kann in reiner Form, oder in einem Gemisch eines für den Prozeß inerten Gases beispielsweise mit mindestens einer Komponente aus der Gruppe von N₂, CO₂, Ar, He und Kr vorliegen. Der Wasserstoffanteil kann dabei zwischen >0 bis 100 % liegen. Bevorzugt wird ein Wasserstoffanteil zwischen 50 und 100%.

In einer Weiterbildung der Erfindung ist der Reaktionslösung ein weiteres Enzym zugegeben, welches ein Substrat umsetzt. Für diese zweite Umsetzung mit diesem Enzym 2 kann der, durch die Hydrogenase umgesetzte, Mediator als Cofaktor oder allgemeiner als Mediator dienen, der durch die anschließende wiederholte Umsetzung mit der Hydrogenase, wieder regeneriert wird, indem er mit Wasserstoff hydriert wird.

Das Enzym 2 kann beispielsweise eine Alkoholdehydrogenase sein, welche ein Keton zu einem Alkohol umsetzt. In einem derartigen Cyclus wird beispielsweise NADP⁺ mittels der Hydrogenase zu NADPH umgesetzt, welches als H⁻-Donor für die Reduktion des Ketons zu einem Alkohol dient. Hierbei entsteht wiederum NADP⁺, welches durch die Hydrogenase erneut regeneriert wird. Als Substrate für die zweite Reduktion können in diesem Beispiel Acetophenon oder Aceton genannt werden.

Weitere Enzyme E2 sind beispielsweise aus *Thermoanaerobium brockii* (ADH), (*Pyrococcus furiosus* (GDH) erhältlich. Grundsätzlich kann der erfindungsgemäße Prozeß der Mediatorregenerierung mit jeder weiteren Enzymreak-

tion gekoppelt werden, die den regenerierten Mediator benötigt.

Somit wird die Hydrogenasereaktion mit einer weiteren enzymatischen Reaktion gekoppelt. Typische Beispiele für Reaktionen des Enzyms 2, welche mit der Regenerierung des Mediators gekoppelt werden können, sind in „Wong, C.-H.; Whitesides, G.M.; 1994 Enzymes in synthetic organic chemistry“ Baldwin, J.E.; Magnus, P.D.; Tetrahedron organic chemistry series; Oxford; Elsevier Science Ltd. ; Vol 12; 370 Seiten“ beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann also sowohl zur Produktion von Mediatoren, als auch zu deren in situ Regenerierung in gekoppelten Systemen eingesetzt werden. Die angekoppelte Enzymreaktion mit dem Enzym 2 wird durch den Wasserstoff nicht gestört, vielmehr stellt der Wasserstoff sogar eine Inertatmosphäre für die Reaktion dar.

Die Prozessführung kann in einem Satzreaktor erfolgen. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Reaktion in einem Membranreaktor, wie er beispielhaft im deutschen Patent 44 36 149 beschrieben ist, durchgeführt werden, welcher mit einer Ultrafiltrationsmembran ausgestattet ist, die die Retention der Hydrogenase ermöglicht. Der Membranreaktor kann als repetitiv batch oder als kontinuierlicher Reaktor eingesetzt werden. Die Prozeßführung im kontinuierlich betriebenen Membranreaktor ist besonders bevorzugt.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Methode wird die Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* wiederholt in einem 'repetitiv batch' Verfahren eingesetzt, um NADPH

zu produzieren. Hierdurch ergeben sich geringe Katalysatorverbrauchsrate und hohe Produktivitäten. Bei dem in Beispiel 6 dargestellten Experiment wurde eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von $10\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ erreicht. Bei dem in Beispiel 7 angeführten Experiment wird ein Katalysatorverbrauch von weniger als $0,1\text{ mg Protein/gNADPH}$ und eine maximale Raum-Zeitausbeute von $74\text{g/L}^{-1}\text{d}^{-1}$ erzielt. In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Methode wird die Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* zur Cofaktorregenerierung von NADPH bei der asymmetrischen Reduktion von prochiralen Ketone mittels einer Dehydrogenase eingesetzt. Bei dem in Beispiel 6 angeführten Experiment wird eine Zyklenzahl von 100, bei Beispiel 1 von 320 erreicht.

Folgende Vorteile ergeben sich aus dem hier vorgestellten Verfahren:

- Bei der hier verwendeten Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* handelt es sich um ein besonders stabiles Enzym, welches wie durch die repetitiv batch Experimente gezeigt, vielfach wiederverwendet werden kann.
- Der Katalysator kann sowohl in gekoppelten als auch alleinig eingesetzt werden.
- Da die Hydrogenase aus einem thermophilen Stamm kommt, kann sie wie in den Ansprüchen beschrieben, über einen weiten Temperaturbereich eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Umsetzung der Pyrodinnucleotide unterliegt keiner thermodynamischen Limitierung. Dies ist überraschend und besonders vorteilhaft, da höhere Umsätze als bei mit Cosubstraten gekoppelten Regeneriersystemen erreicht werden.

Die Figuren zeigen Versuchsergebnisse:

Es zeigt:

Fig.1: Umsatz-Zeit-Verlauf für die Reaktion
Acetophenon → Phenylethanol Beispiele
4 und 5.

Fig.2: Repetitive Batch-Versuche für die Reaktion aus Fig. 1 (Beispiel 6).

Fig.3: Ausbeute von NADPH für Repetitive
Batch-Versuche gemäß Beispiel 7.

Fig.4: Abhängigkeit der NADPH-Bildung von der Temperatur.

Beschreibung der Katalysatorpräparation

In der hier dargestellten Erfindung wird eine *in vitro* Methode beschrieben, welche molekularen Wasserstoff als reduzierendes Agens für die Darstellung von Pyridin-Nukleotiden und Farbstoffen mittels einer löslichen Hydrogenase ermöglicht. *Pyrococcus furiosus* (DSM 3638) wurde entsprechend der in der Literatur angegebenen Vorschrift kultiviert, unter Zusatz von Tafelsalz und Kartoffelstärke (Hagedoorn, P.-L., M. C. P. F. Driessen, M. van den Bosch, I. Landa, and W. R. Hagen. 1998. Hyperthermophilic redox chemistry: a re-evaluation. FEBS Lett. 440: 311-314). Die Zellen wurden durch Autolyse aufgeschlossen. Hierzu wurden 100 g Biofeuchtmasse in

400 mL 50 mM Tris-HCl pH 8,0 suspendiert, und 10 µg/mL DNase und RNase zugegeben. Nach 4 h bei Raumtemperatur wurde das Zellextrakt für 1 h bei 30.000 g abzentrifugiert. Aus dem so gewonnenen Zellüberstand (verdünntes, zellfreies Extrakt, 5 - 10 mg Protein/mL) wurden 3 verschiedene Präparationen hergestellt:

- 1) Zellfreies Extrakt wurde mittels Ultrafiltration (Amicon YM 10 Membran) auf 30 mg/mL aufkonzentriert und über Nacht mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0 Puffer dialysiert.
- 2) Zu dem zellfreien Extrakt wurde Ammoniumsulfat hinzugesetzt, bis zu 10%iger Sättigung. Die so erhaltene Suspension wird für 15 min. bei 30.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit Ammoniumsulfat bis zu 60% gesättigt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt, wird das Pellet resuspendiert und gegen 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8 dialysiert. Die Proteinkonzentration beträgt 30 mg/mL.
- 3) Das zellfreie Extrakt wird auf eine Source 15Q-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit 250 mM NaCl eluiert. Die Fraktionen, welche Hydrogenaseaktivität enthalten, werden mittels Ultrafiltration (Amicon YM 30 Membran) bis 30 - 50 mg Protein/mL aufkonzentriert.

In der löslichen zellfreien Fraktion des hypothermophilen Archae-Bakteriums *Pyrococcus furiosus* liegen zwei verschiedene Hydrogenasen vor (Ma, K., Weiss, R. and Adams, M.W.W. Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in

sulfur reduction. J. Bacteriol., 2000, 1864-1871). Die Hydrogenase 1 (90% der Gesamtaktivität) eluiert bei 0,25 M NaCl von der Ionenaustauschchromatographiesäule und die Hydrogenase 2 bei 0,4 M NaCl (10% der Gesamtaktivität). Die Fraktionierung erfolgte unter einer Argonatmosphäre und die Fraktionen werden bei -80°C gelagert. Die Hydrogenaseaktivität (H₂-Bildung) wird bei 40°C gemessen (Silva P.J.; Van den Ban E.C.D.; Wassink H.; Haaker H.; De Castro B.; Robb F.T.; Hagen W.R. Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. Eur. J. Biochem., 2000. 267, 6541-6551). Wenn eine der zuvor beschriebenen Enzympräparationen für die Darstellung oder die Kofaktorregenerierung von NADPH benutzt werden soll, muss zuvor eine noch anwesende Phosphataseaktivität, welche die Dephosphorylierung von NADP⁺ zu NAD⁺ katalysiert, entfernt werden. Für die drei zuvor beschriebenen Enzympräparationen sind in Tabelle 1 die entsprechenden Aktivitäten an Hydrogenase und Phosphatase angegeben. Hierbei wurde die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung von NADP⁺ unter folgenden Bedingungen bestimmt: 50 mM EPPS pH 8,0, 0,5 mM NADPH, Proteinprobe, 40°C, Gesamtvolumen 1,5 ml. Es konnte keine Phosphodiesteraseaktivität detektiert werden.

Tabelle 1: Spezifische Aktivitäten der Hydrogenase und Phosphatase. Alle Aktivitäten wurden bei 40°C bestimmt.

Fraktion	Hydrogenase NADP ⁺ Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Phosphatase NADP ⁺ Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Zellfreies Ex- trakt	0,37	1,6E-4
60% (NH ₄) ₂ SO ₄ - Ausfall	0,69	8,9E-5
Source 15Q Frak- tion	1,55	1,1E-4

5

Eine hohe Stabilität der Hydrogenase ist nur gegeben, wenn anaerobe Bedingungen vorliegen. Die Reduktion von NADP⁺ wird nur in Gegenwart von Wasserstoff durchgeführt. Entsprechende Vorkehrungen zum Ausschluss von störenden Komponenten wurden getroffen.

10

Beispiel 1:

15

Die Reaktionsstabilität wurde mittels eines fed-batch Experimentes getestet. 1,6 Units Hydrogenase werden in 3 ml 200 mM EPPS, pH 8,0 bei 80°C für 5 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 8 mM (24 μmol) wurde die Lösung bei 40°C unter Wasserstoffatmosphäre für 24 h inkubiert. Nach jeder NADP⁺-Zugabe wurde quantitativer Umsatz bezüglich des frischen Substrats nach einer Stunde erzielt. Allerdings wurde hierbei festgestellt, dass das produzierte NADPH instabiler als das zudosier-

20

te NADP^+ ist. Der Zerfall von NADPH ist nicht enzymkatalysiert. Die Halbwertszeit von NADPH in den verschiedenen Experimenten war durchschnittlich 20 h. Ähnliche Halbwertszeiten für NADPH bei 41°C sind in der Literatur beschrieben. Eine HPLC-Analyse nach Reaktionszeit von 2 und 48 h zeigte keine Zerfallsprodukte, die durch Phosphatase oder durch Phosphodiesteraseaktivität hervorgerufen sein könnten.

Beispiel 2:

Die Standardoxidations- und Reduktionspotentiale von $\text{H}^+ - \text{H}_2$ und einer $\text{NADP}^+ - \text{NADPH}$ bei pH 8 unterscheiden sich um 133 mV. Unter der Annahme, dass keine Inhibierung der Hydrogenase durch eines ihrer Edukte oder Produkte vorliegt, muß das Enzym befähigt sein, die Pyridinnukleotidcofaktoren komplett zu reduzieren. Eine Potentialdifferenz von 133 mV bei pH 8.0 und einer Wasserstoff-Atmosphäre verschiebt das Gleichgewicht von $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ zu 24.000/1 (Clark, W.M. usw.). Dieses heißt, dass es keine thermodynamische Limitierung für die Reduktion von Pyridinnukleotiden durch H_2 gibt. Dieses wurde nachgewiesen, in dem der folgende Testansatz durchgeführt wurde: 3,9 Units Hydrogenase wurden unter Wasserstoffatmosphäre in einem Volumen von 3 mL 1 M EPPS-Puffer, pH 8.0, 110 mM NADP^+ inkubiert. Nach 240 Minuten war quantitativer Umsatz erreicht.

Beispiel 3:

Die reduktive Aminierung von zwei Ketoglutarat zu Glutamat wird durch die Glutamatdehydrogenase (GDH) katalysiert, welche NADPH abhängig ist. Zur Regenerierung wurde hier die Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt. Die Reaktionslösung bestand aus 50 mM Tris/HCL-Puffer, pH 7,5, 50 mM NH₄CL, 0,2 Units GDH und 0,06 Units Hydrogenase aus einem zellfreien Extrakt. Aufgereinigte Glutamatdehydrogenase von *Pyrococcus furiosus* wurde als Testsystem der reduktiven Kofaktorre-generierung benutzt. Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, konnte bei 50 C innerhalb von 16 h genügend NADPH regeneriert werden, um zu 100 % Umsatz von 2-Ketoglutarat zu Glutamat zu gelangen, welches unter den zuvor genannten Reaktionsbedingungen einer Zyklenzahl (TTN) von 100 entspricht.

Tabelle 2: Umsetzung von 50 mM 2-Ketoglutarat zu Glutamat durch *P. furiosus* GDH mit NADPH Regenerierung durch Hydrogenase in einem zellfreien Extrakt aus *P. furiosus*.

NADP ⁺ (mM)	Glutamat (mM)	Gesamte Zyklenzahl- NADP ⁺
0.1	32	
0.2	47	320
0.5	52	235
		100

Beispiel 4:

Eine Lösung von 10mM Acetophenon in 50mM wäßrigem Kaliumphosphatpuffer (pH8) mit 0,5mM oxidiertem Kofaktor NADP⁺ und eine NADP⁺-abhängige Alkoholdehydrogenase (ADHM) wird mit Durchströmen der Lösung mit wassergesättigtem Helium entgast. Zu dieser Lösung werden 20µL einer aktivierten Enzympräparation (5 Minuten bei 80°C unter Wasserstoffatmosphäre) aus *Pyrococcus furiosus* gegeben, so daß die Proteinkonzentration 0.1mg/mL entspricht. Die Zugabe erfolgt durch ein gasdichtes Septum mittels einer geeigneten Spritze. Die Lösung wird bei 40°C gehalten. Die inerte Argonatmosphäre wird durch Wasserstoff ersetzt. Von der gerührten Reaktionslösung werden Proben genommen und ohne weitere Aufarbeitung per Gaschromatographie (GC) hinsichtlich Umsatz und Enantiomerenüberschuß bzw. -verhältnis analysiert. Es wurde quantitativer Umsatz nach 3 Stunden bei einem Enantiomerenüberschuß größer als 99.5% erreicht. GC: Agilent 6890GC mit einer Kapillarsäule Chirasil-Dex (Chrompack-Varian, Deutschland) Umsatz-Zeit-Kurve zeigt die Figur 1 (Kreise). Die Zyklenzahl (TTN) bezüglich NADP⁺ entspricht 20.

25

Beispiel 5:

Konzentrationen wie in Beispiel 4, die Kofaktorkonzentration wurde auf 0,1mM erniedrigt. Die Umsatz-Zeitkurven sind für beide Kofaktorkonzentrationen in der Figur 1 gezeigt (Dreiecke).

Es wurde quantitativer Umsatz nach 3.5 Stunden bei einem Enantiomerenüberschuß größer als 99.5% erreicht. Die Zyklenzahl (TTN) bezüglich NADP⁺ entspricht 100.

5

Beispiel 6:

10

15

20

25

In einer modifizierten Ultrafiltrationszelle (Amicon, Deutschland), die mit einer Ultrafiltrationsmembran (YM10, Amicon) ausgestattet ist, werden die oben beschriebenen Lösungen unter Argonatmosphäre eingefüllt. Der Auslauf der Zelle wird periodisch geöffnet und das Permeat der Ultrafiltrationszelle mittels GC auf Umsatz und Ausbeute analysiert. Der Auslauf wurde mit negativem Ergebnis auf Proteingehalt überprüft. Nachdem mehr als 95% des Umsatzes erreicht wurden, wurde der Zelleninhalt bis auf ein minimales Restvolumen filtriert, und wieder mit der gleichen Lösung befüllt. Bei der Befüllung wurde nur Alkoholdehydrogenase (ADHM) zu den Zeitpunkten nachdosiert, die in der Figur 2 kenntlich gemacht wurden.

Beginnend mit dem sechsten Zyklus wurde das Substrat von Acetophenon auf (S)-2-Hydroxy-1-phenyl-propanon gewechselt. Als Produkt wurde 1,2-Dihydroxyphenylpropanon mit hohem Enantiomerenüberschuß erhalten. Der Zyklus wurde achtmal wiederholt. Die Ergebnisse der ersten sechs Zyklen sind in Figur 2 gezeigt.

Beispiel 7:

In einer modifizierten Ultrafiltrationszelle (Amicon, Deutschland), die mit einer Ultrafiltrationsmembran (YM10, Amicon) ausgestattet ist, werden 3 ml 200 mM EPPS, pH 8,0, 12mM NADP⁺ unter Argonatmosphäre eingefüllt. Der Auslauf der Zelle wird periodisch geöffnet und das Permeat der Ultrafiltrationszelle mittels Capillarelektrophorese auf Umsatz und Ausbeute analysiert. Der Auslauf wurde mit negativem Ergebnis auf Proteingehalt überprüft. Nachdem mehr als 95% des Umsatzes erreicht wurden (bzgl. NADP⁺), wurde der Zelleninhalt bis auf ein minimales Restvolumen (ca. 0.2mL) filtriert, und wieder mit der gleichen Lösung befüllt. Dabei wurden verschiedene Wasserstoffdrücke beaufschlagt.

Der Zyklus wurde achtmal wiederholt. Dabei wurde ab dem 7.Zyklus der Druck auf 7.5bar Wasserstoff erhöht. Es wurde keine Hydrogenasepräparation zugesetzt. Das Permeat wurde mittels Kapillarelektrophorese untersucht. (Beckmann PACE MDQ, Kapillare: fused silica, 24°C, U=20 kV, c(Total)=100 mM, 50\% Kaliumphosphat (50 mM Kaliumphosphat + 50 mM Borat), pH=6)

Die Ergebnisse sind in Figur 3 dargestellt.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur enzymatischen Reduktion von Substraten mit molekularem Wasserstoff,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Enzym eine Hydrogenase und als Substrat ein
5 Mediator ausgenommen NAD^+ ohne Zugabe eines zweiten Mediators eingesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt
10 wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Mediator eine Komponente aus der Gruppe
 NADP^+ , FMN, PMS, DCPIP, Janus Grün, Methylenblau
15 und FAD ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Reaktion in wäßrigem Medium durchgeführt
wird.
- 20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Reaktion in einem pH-Bereich zwischen 6 und 10 stattfindet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Umsetzung in einem Temperaturbereich zwischen -10°C und 150°C durchgeführt wird.
- 5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Reaktion in einem Druckbereich zwischen 0 und 300 bar durchgeführt wird.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Reaktion in einem Druckbereich zwischen 0 und 20 bar durchgeführt wird.
- 15 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Wasserstoff in reiner Form oder in einem Gemisch mit einem für den Prozeß inerten Gas vorliegt und dabei die flüssige Phase überschichtet.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Inertgas mindestens eine Komponente aus der Gruppe bestehend aus CO_2 , He, Ar, Kr oder N_2 ist.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Wasserstoffkonzentration in der Gasphase 50 bis 100 % beträgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß dem Reaktionsgemisch ein zweites Enzym und ein
zweites Substrat zugesetzt wird, welche zu einem
Produkt umgesetzt wird, so daß eine Kopplung mit
einem weiteren chemischen Prozeß stattfindet.
13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß als zweites Enzym eine Alkoholdehydrogenase zu-
gefügt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß als zweites Substrat ein Keton eingesetzt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Reaktion in einem Membranreaktor durchge-
führt wird, welcher mit einer Ultrafiltrationsmemb-
ran ausgestattet ist, welche die Retention von En-
zymen bewirkt.

1/4

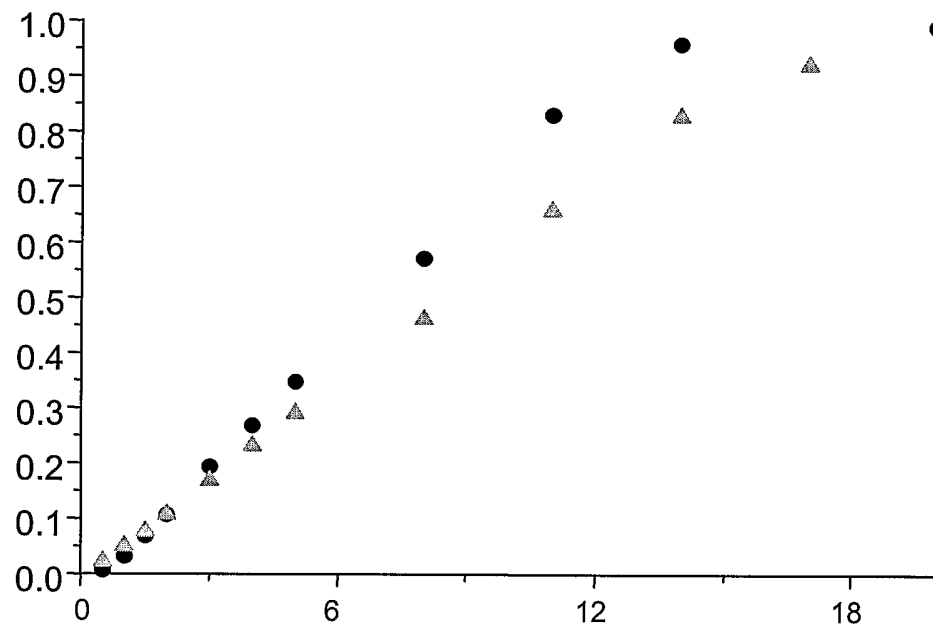


Fig. 1:

Ordinate: Umsatz; Abszisse: Zeit/h, Verlauf der Experimente zu den Beispielen 4 (Kreise) und 5 (Dreiecke)

2/4

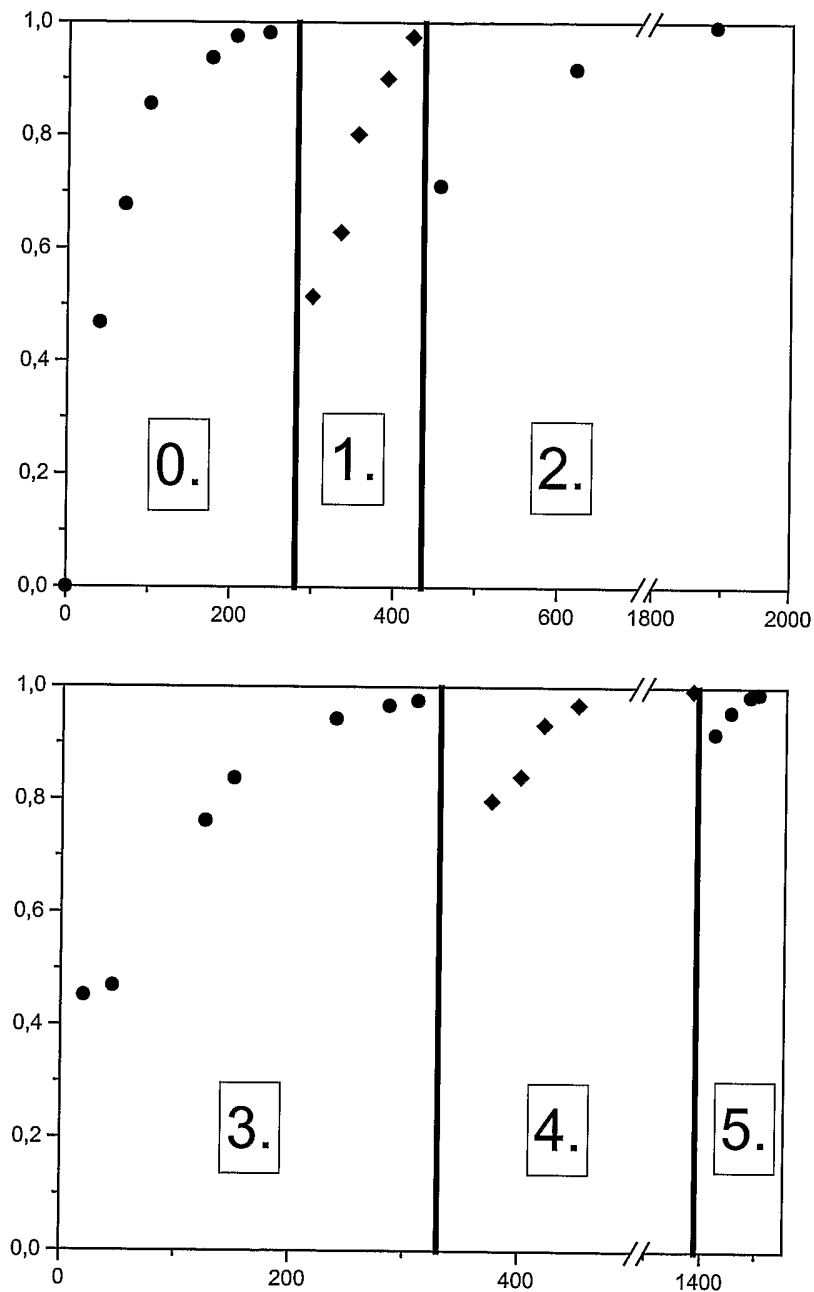


Fig.2:

Ordinate: Umsatz Acetophenon; Abszisse: Zeit /min; Repetitive Batch zur Produktion von Phenylethanol: Startbedingungen 0,5mM NADP⁺; 50mM Kaliumphosphatpuffer pH 8; 40°C; 1mg/mL Hydrogenase; 1mg/mLADH

3/4

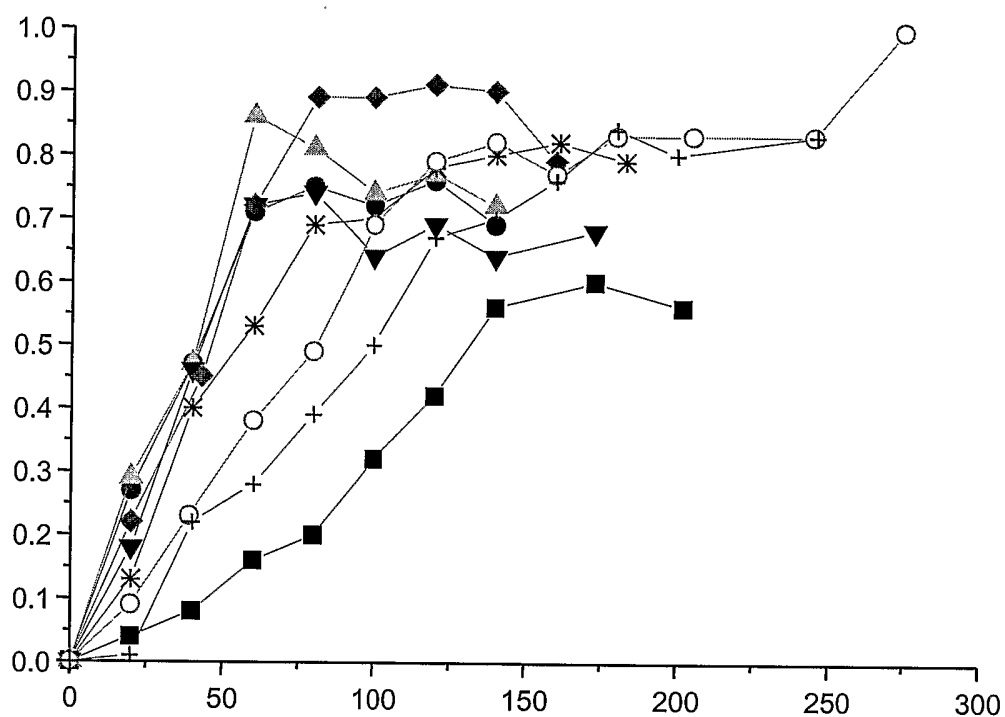
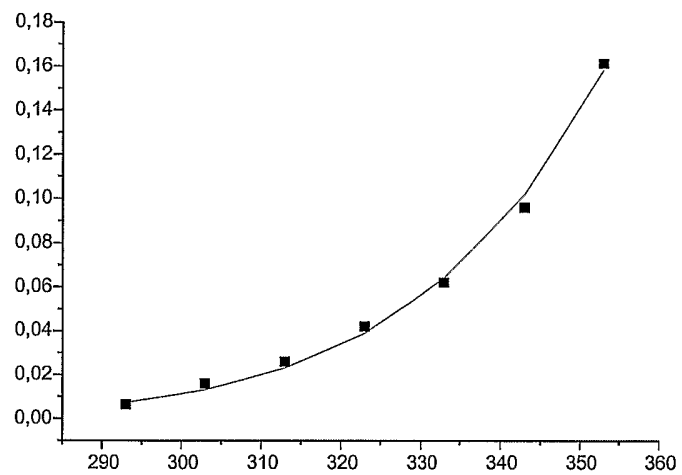


Fig. 3:

Ordinate Ausbeute NADPH; Abszisse: Zeit/min; Repetitive Batch zur Produktion von NADPH; Startbedingungen: 12mM NADP⁺; 200mM EPPS Puffer pH 8.0, 40°C; 1mg/mL Hydrogenase; Reihenfolge der Versuche: Quadrate, geschlossene Kreise; Dreiecke (Spitze nach oben); Dreiecke (Spitze nach unten); Rauten, Sterne, offene Kreise; Kreuze

4/4

**Fig. 4:**

Ordinate: Bildungsrate NADPH / (μmol/min/mg Protein); Abszisse: Temperatur /K; Aktivität der Hydrogenase als Funktion der Temperatur. Man erhält eine Aktivierungsenergie von 43 kJ/mol (Kurve).