

Abschlussbericht

Förderkennzeichen:	SAS-2015-IOW-LWC
Zuwendungsempfänger:	Dr. Jan von Langermann Prof. Dr. Udo Kragl
Kooperationspartner:	Dr. Thomas Werner Prof. Dr. Matthias Beller
Vorhabensbezeichnung:	Kristallisationsbasierte Abtrennung von organischen Phosphaten „Crysphos“
Laufzeit des Vorhabens:	01.06.2018 - 31.08.2018
Autoren:	Dr. Jan von Langermann Prof. Dr. Udo Kragl

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	2
2 Einleitung und Ziele des Projektes	2
3 Resultate und Diskussion	3
4 weitere Leistungen aus dem Projekt*	6
5 Literaturverzeichnis	7

* z.B. Beiträge auf Konferenzen, Publikationen (mit Status), Drittmittelanträge (mit Status)

1. Zusammenfassung

Das Seed-Projekt „Cryphos“ untersuchte die gezielte Kristallisation von organischen Phosphaten mittels Metallionen aus der Gruppe der Lanthanoide, welche schlussendlich hierüber eine potentielle Rezyklierung ermöglichen soll. Die experimentellen Arbeiten zeigten deutlich, dass für nahezu alle untersuchten organischen Phosphate eine nahezu quantitative Abtrennung möglich ist, wobei zusätzlich die Löslichkeitsunterschiede zwischen Lanthan- und Yttrium-Salzen ausgenutzt werden können.

2. Einleitung und Ziele des Projektes

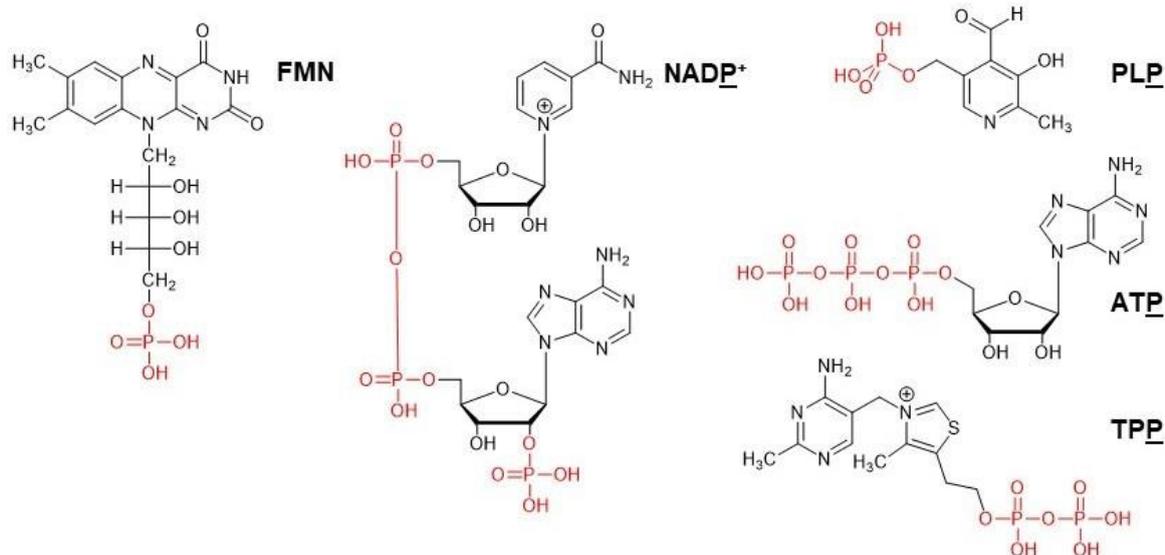
Das grundlegende Ziel des Seed-Projektes „Cryphos“ ist die Kristallisation von organischen Phosphaten, welche speziell für die Verwendung innerhalb von biokatalytischen Synthesereaktionen relevant sind. Trotz des hohen Preises einige der Phosphate schließt die übliche Form der Prozessführung nur eine einmalige Verwendung dieser Verbindungen ein, welche üblicherweise im Zuge des Downstream-Processing der gewünschten Produkte nicht weiter beachtet und schlussendlich ungenutzt entsorgt werden. Einige wenige Verfahren ermöglichen zwar ein indirekte (partielle) Wiederverwendung durch eine Rezyklierung der Reaktionslösung, wobei aber auch hier nach 2-3 batch-Reaktionen die verbleibende Mutterlauge, incl. der organischen Phosphate, ungenutzt entsorgt wird.

An diesem Punkt setzt das Seed-Projekt an und untersuchte die Kristallisation der organischen Phosphate durch die Verwendung von Metallionen aus der Gruppe der Lanthanoide und zusätzlich Yttrium. Das Projekt ist allgemein in 2 Teile aufgeführt, wobei im ersten Teil die generellen Löslichkeiten incl. der relevanten Kristallisationsbedingungen bestimmt wurden und im zweiten Teil grundlegende Untersuchungen bzgl. der Rezyklierung der erhaltenen Kristallisate untersucht wurde. Das Projekt wurde erfolgreich abgeschlossen und alle untersuchten Verbindungen (siehe unten) konnte nahezu quantitativ abgetrennt werden.

3. Resultate und Diskussion

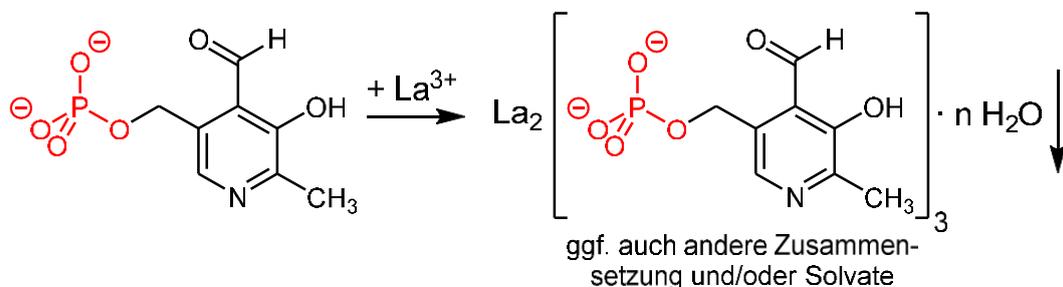
3.1. Untersuchungen Salzlöslichkeiten und Kristallisation

Als Modelverbindungen für die biokatalytisch-relevant organischen Phosphate wurden die folgenden Verbindungen ausgewählt: Pyridoxal-5-phosphat (PLP), Thiaminpyrophosphat (TPP), Nicotinsäureamidadeninindinukleotidphosphat (NADP⁺), Adenosintriphosphat (ATP) und Flavinmononucleotid (FMN) (Beispiel PLP, Schema 1).



Schema 1: Untersuchte, für biokatalytische Reaktionen relevante organische Phosphate

Alle genannten Verbindungen sind wichtige biologische Cofaktoren, welche vorwiegend in den Arbeitsgruppen von Langermann und Kragl eingesetzt werden, z. Bsp. die PLP für die biokatalytische Synthese von Aminen via Amintransaminasen [1-4]. Diese wurden innerhalb der vorgestellten Studie als Metallsalze ausgefällt (Schema 2).



Schema 2: Beispiel einer der untersuchten Kristallisationen; Fällung von Lanthan Pyridoxal-5-phosphat.

Konsistent mit den Arbeiten von Brzyska *et al.* (einfache organische Phosphate, z. Bsp. Pyruvat)[5] und eigenen vorgeschalteten Untersuchungen ergab sich sehr früh, dass kaum Unterschiede in den Löslichkeiten der Phosphat-Salze innerhalb der Gruppe der Lanthanoide erzielt werden. Dieser Umstand basiert auf der bekannten relativ chemischen Ähnlichkeit. Aus diesem Grund wurden alle weiterführenden Untersuchungen anhand von Lanthan und Cer durchgeführt, da diese die kostengünstigsten Vertreter darstellen. Zusätzlich wurde Yttrium als weiteres Element der 3. Nebengruppe in die Untersuchungen aufgenommen, da ähnliche Eigenschaften der Salze ermöglicht werden.

Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl La^{3+} also Ce^{3+} nahezu quantitative Fällung ermöglichte, was auf Grund der genannten chemischen Ähnlichkeit zu erwarten wurde. Löslichkeiten im Bereich von <1 mM wurden erreicht. Im Gegensatz dazu wurden mit Yttrium-Salzen leicht höhere Löslichkeiten der Salze der organischen Phosphate erzielt, welche leider keine vollständige Abtrennung ermöglichte (Tabelle 1). In Kombination der oft geringen finalen Konzentration in den Reaktionslösungen ist die Anwendung von Yttrium zur Fällung der Phosphate nur sehr begrenzt.

Tabelle 1: Übersicht der bestimmten Salzlöslichkeiten der organischen Phosphate; La^{3+} , Ce^{3+} und Y^{3+} (pH 7 -8; vereinfachte Darstellung)

	PLP	TPP	NADP+	ATP	FMN
La^{3+}	<1 mM	<1 mM	<1 mM	<1 mM	<1 mM
Ce^{3+}	<1 mM	<1 mM	<1 mM	<1 mM	<1 mM
Y^{3+}	<5 mM	<10 mM	<5 mM	<1 mM	>5 mM

Die außergewöhnlich geringe Löslichkeit und damit einhergehende äußerst effiziente Fällung des Cofaktors PLP in Form des in Schema 1 gezeigten Lanthan-PLP-Salzes ist beispielhaft in Abbildung 1 gezeigt. Auf Grund des äußerst hohen Extinktionskoeffizienten im sichtbaren Bereich erscheinen selbst äußerst geringe PLP-Konzentrationen als kräftige gelbe Lösungen. Die Kristallisation als äußerst unlösliches Lanthan-Salz führt zu einer vollständigen Entfärbung der Reaktionslösung und Anreicherung von PLP als Kristallisat.



Abbildung 1:
 $\text{La}_x(\text{PLP})_y \cdot n \text{H}_2\text{O}$ mit
 überstehender klarer
 Mutterlauge

Nahezu identische Ergebnisse wurden mit biokatalytischen Reaktionslösungen erhalten, welche nach Extraktion der erwünschten chiralen Produkten mit La^{3+} -Lösungen gefällt wurden. Einzige Einschränkung des gezeigten Verfahrens ist die Vermeidung von weiteren Phosphaten in der Reaktionslösung, z. Bsp. Phosphatpuffer, welche selbstverständlich ebenso mit La^{3+} gefällt werden. In den Untersuchungen wurde daher auf andere Pufferlösungen (TRIS, HEPES, etc.) zurückgegriffen.

3.2. Untersuchungen zur potentiellen Rezyklierung der gefällten Salze

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurden grundlegende Untersuchungen bzgl. der potentiellen Rezyklierung der gefällten Lanthan- und Yttrium-Salze unternommen. Das Ziel ist die Wiederverwendung nach erfolgtem Einsatz in biokatalytischen Reaktionen.

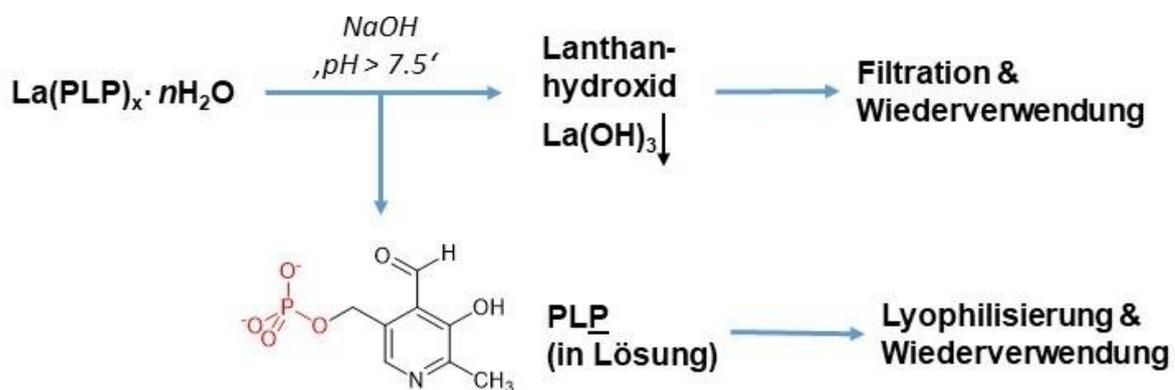


Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung der finalen Downstream-Processing-Strategie zur Wiederverwendung von Lanthan und PLP aus Amintransaminase-katalysierten Reaktionslösungen

Die pH-abhängige Löslichkeit der Lanthan-, Cer- und Yttrium-Salze ermöglicht das Wiederauflösen der Verbindungen nach Filtration von der ursprünglichen Reaktionslösung (Abbildung 2). Ein pH-Wechsel in den mild basischen Bereich führt parallel zur Fällung von Lanthanhydroxid $\text{La}(\text{OH})_3$, welches unkompliziert abfiltriert und zur Wiederverwendung zugeführt werden kann. Die verbleibende Lösung, welche die organischen Phosphate in Lösung enthält, kann nachgeschaltet aufgereinigt und beispielsweise durch Lyophilisierung wieder in eine Verwendungsform für eine erneute Verwendung in biokatalytischen Reaktionen gebracht werden.

Es ist hierbei anzumerken, dass einige organischen Phosphate hydrolyseempfindlich bei höheren pH-Werten sind, z. Bsp. ATP, so dass die vorgestellte Aufarbeitungsstrategie unter strikter pH- und insbesondere zeitlichen Kontrolle durchgeführt werden muss.

4. Weitere Leistungen aus dem Projekt

Basierend auf den Ergebnissen aus dem Seed-Projekt wurden die grundlegenden Ergebnisse (teilweise) in Vortragsform auf den folgenden Tagungen vorgestellt.

- Hülsewede, D.; Süß, P.; Menyes, U.; von Langermann, J.
"Development of an in situ-Product Crystallization (ISPC) to Shift the Reaction Equilibria of Selected Transaminase-Catalyzed Reactions"
Tagung: ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2018, Aachen, Germany
10.-13.9.2018
(nur grundlegende Kristallisationsergebnisse vorgestellt)
Der Abstract erschien ebenso in Chemie Ingenieur Technik, 90, 1259-1260 (2018).
- von Langermann, J.
"Integration of separation techniques into biocatalytic processes for the synthesis of enantiopure compounds"
Sondervortrag, OCI-Kolloquium, Universität Bielefeld, Bielefeld, Germany
16.7.2018
(nur grundlegende Kristallisationsergebnisse vorgestellt)
- Darüber hinaus ist eine detaillierte Darstellung als Posterbeitrag auf der kommenden Tagung „14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations“ (Biotrans 2019) in Groningen, Niederlande geplant. (Abstract ist aktuell in der Fertigstellung)

Basierend auf den Ergebnissen wird aktuell ebenso ein Förderantrag für ein DFG-Einzelvorhaben erstellt, wobei mit der Fertigstellung im Laufe des Jahres 2019 zu rechnen ist. Der Inhalt des Vorhabens ist neben der Kristallisation der organischen Phosphate auf weitere Verbindungen ausgerichtet, welche ebenso einen Bezug zu biokatalytischen Reaktionen ist.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Hülsewede, D.¹; Meyer, L.-E.¹; von Langermann, J. (¹geteilte Erstautorschaft)
“Application of *in situ*-Product Crystallization and Related Techniques in Biocatalytic Processes”
Chemistry - A European Journal (angenommen in 2018, Publikation erwartet in 2019)
- [2] Meyer, L.-E.; Plasch, K.; Kragl, U.; von Langermann, J. “Adsorbent-based downstream-processing of the decarboxylase-based synthesis of 2,6-dihydroxy-4-methylbenzoic acid”
Organic Process Research & Development, 22, 963-970 (2018)
- [3] Hülsewede, D.; Tänzler, M.; Süß, P.; Mildner, A.; Menyes, U.; von Langermann, J.
“Development of an *in situ*-Product Crystallization (ISPC)-Concept to Shift the Reaction Equilibria of Selected Amine Transaminase-Catalyzed Reactions”
European Journal of Organic Chemistry, 18, 2130-2133 (2018)
- [4] Meyer, L.-E.; von Langermann, J.; Kragl, U.
“Recent developments in biocatalysis in multiphasic ionic liquid reaction systems”
Biophysical Reviews, 10, 901-910 (2018)
- [5] Brzyska, W.; Ozga, W.
“Complexes of Y, La and light lanthanides with pyruvic acid”
Polish Journal of Chemistry, 58, 385-391 (1984)