

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.02.040

❖ 技术与方法 ❖

微生物全细胞转化液中 L-哌啶甲酸的分离提纯

李康, 朱帆, 何珣, 陈可泉

(南京工业大学材料化学工程国家重点实验室, 生物与制药工程学院, 江苏 南京 210009)

【摘要】目的: 筛选适用于分离提纯微生物全细胞转化液中 L-哌啶甲酸的树脂, 并且确定 L-哌啶甲酸分离提纯的工艺条件。**方法:** 首先采用静态吸附法比较六种树脂对 L-哌啶甲酸和 L-赖氨酸的吸附量、选择性分离系数, 以及考察温度对吸附量和回收率的影响, 然后考察 L-哌啶甲酸的动态吸附—洗脱条件。**结果:** 在六种树脂中, D103-MTBE 催化树脂可以获得最高的 L-赖氨酸/L-哌啶甲酸选择性分离系数; 在 20 × 380 mm 层析柱, 1 mL/min 上样流速, 0.04% (v/v) 氨水洗脱液, 0.4 mL/min 洗脱液流速的条件下, L-哌啶甲酸的回收率为 96.33%。**结论:** 该分离提纯方法操作简单, 对环境无污染, 同时可以获得较高的产品纯度和回收率, 适合应用于放大生产。

【关键词】 L-哌啶甲酸; 微生物全细胞转化液; 分离; 提纯; 树脂

【中图分类号】 TS201.3 **【文献标志码】** A

Separation and purification of L-pipecolate from the microbial whole-cell biocatalyst liquid

LI Kang, ZHU Fan, HE Xun, CHEN Ke-quan

(State Key Laboratory of Materials-Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective: To screen a proper resin for the separation and purification of L-pipecolate in the microbial whole-cell biocatalyst fluid, and then optimize the separation conditions. **Methods:** The static adsorption method was used to investigate the adsorption capacity and selective separation coefficient of L-pipecolate and L-Lysine by 6 resins, then the effects of temperature on the adsorption capacity and recovery of L-pipecolate were also investigated, and the dynamic adsorption elution conditions of L-pipecolate was investigated. **Results:** D103-MTBE resin could get the highest selective separation coefficient of L-lysine/L-pipecolate, and the maximum recovery rate of L-pipecolate was 96.33% under the condition of a 20 mm × 380 mm chromatography column, a flow rate of 1 mL/min, 0.04% (V/V) ammonia water eluent and a eluent flow rate of 0.4 mL/min. **Conclusion:** This separation and purification method was easy and environment-friendly, and could get high purity and recovery rate of L-pipecolate, which indicated that this separation and purification method would be suitable for application in the sustainable production of L-pipecolate.

【Key words】 L-pipecolate; Microbial whole-cell biocatalyst liquid; Separation; Purification; Resin

含有哌啶环的生物活性分子 L-哌啶甲酸是一种具有手性的非蛋白质氨基酸, 分为 D 型和 L 型, 等电点 6.62, 是目前合成天然生物碱、强效免疫抑制剂雷帕霉素、淀粉葡萄糖苷酶抑制剂斑莩素, 以及麻醉药罗哌卡因等高附加值哌啶类化合物的重要前体物质^[1-4]。L-哌啶甲酸可以 L-赖氨酸为原料, 通过化学或生物方法合成得到^[5-7]。其中, 化学合成的哌啶甲酸产量较高, 但产物多为 DL 型混合物, 手性拆分成本高; 生物合成(酶催化或微生物转化)的 L-哌啶甲酸手性纯度可以达到 100%^[8], 但产物产

量较低, 目前尚无分离提取方法报道。若能从酶催化或微生物转化体系中尽可能地分离提取出 L-哌啶甲酸, 将有利于提高其生产效率。

L-哌啶甲酸的生物合成过程是利用赖氨酸环化脱氨酶将底物 L-赖氨酸环化和脱氨得到产品。因此, 除了水不溶的酶制剂和微生物细胞之外, 该体系水相中主要包含 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸, 以及少量无机盐^[4,8]。哌啶类化合物和 L-赖氨酸衍生物能够用离子交换方法分离得到, 即利用待分离物质之间的等电点、极性、等性质差异来获得高纯度的单一化

基金项目: 国家自然科学基金(21576134); 江苏省博士后科研资助计划(2019K242)

作者简介: 李康(1994-), 男, 硕士研究生。E-mail: lk93012194@163.com

通讯作者: 何珣。E-mail: xunhe@njtech.edu.cn

合物^[9-10]。例如利用 D103 弱碱阴离子交换树脂和分离水相中的弱酸性芳香族化合物^[11], 以及利用 001 × 7 阳离子交换树脂有效分离了等电点分别为 9.41 和 7.59 的 L-赖氨酸和 L-组氨酸^[12]。本研究针对大肠杆菌的 L-哌啶甲酸转化体系, 采用树脂分离方法, 从树脂筛选、吸附及解吸条件优化等方面, 考察 L-哌啶甲酸分离工艺条件, 并分析了树脂分离提取 L-哌啶甲酸的静态和动态吸附过程。

1 材料与方法

1.1 材料

微生物转化液: 本实验室自制重组 *E. coli* BL21 (DE3) 全细胞催化 L-赖氨酸合成的含 L-哌啶甲酸的转化液^[8]。全细胞转化液经 4 000 rpm, 20 min 离心后, 取上清液进行分离。上清液中含 50 mM 磷酸盐, 15.11 g/L L-哌啶甲酸, 5.23 g/L L-赖氨酸, 上清液 pH 为 7.52。

树脂: WA-3 氨基酸专用树脂、D001 阳离子交换树脂、D113 阳离子交换树脂、D002 阳离子交换树脂、D103-MTBE 催化树脂^[11]、WS-3 催化树脂, 均购自安徽皖树化工有限公司。

1.2 检测方法

美国 Alltech 1500 型高效液相色谱仪检测全细胞转化液和分离液中的 L-哌啶甲酸、L-赖氨酸、磷酸盐浓度。检测条件为: Prevail C₁₈ 色谱柱 (250 × 4.6 mm, i. d. 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 0.4% (v/v) 三氟乙酸水溶液; 流速: 0.5 mL/min; 检测器: 蒸发光散射检测器 (ELSD) 2000ES; 检测器温度: 120 °C; 载气: 氮气; 载气流速: 4 L/min; 进样体积: 10 μL。

1.3 实验方法

1.3.1 树脂预处理 树脂→去离子水洗至中性→1 mol/L 盐酸酸洗 4 h→去离子水洗至中性→1 mol/L 氢氧化钠碱洗 4 h→去离子水洗至中性→1 mol/L 盐酸酸洗 4 h→去离子水洗至中性, 备用。

1.3.2 吸附能力比较 准确分别称取 5 g WA-3 氨基酸专用树脂、D001 阳离子交换树脂、D113 阳离子交换树脂、D002 阳离子交换树脂、D103-MTBE 催化树脂、WS-3 催化树脂。六种树脂分别与 500 mL 转化液按固液比 1:100 混合, 25 °C 恒温振荡。静态吸附 1 h 后测定溶液中的 L-哌啶甲酸和 L-赖氨酸浓度, 分别计算 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的吸附量 q , 以及 L-赖氨酸/L-哌啶甲酸的选择性分离系数 α 。其中, 吸附量 q 是指一种物质在树脂上的吸附质量, 选择性系数 α 是指组分 L-赖氨酸、L-哌啶甲酸的分配系数之比。

$$\text{吸附量 } q = \frac{(c_1 - c_2) \times V}{m} \quad (1)$$

式中: q 为吸附量, mg/g; c_1 为待分离物在溶液中的初始质量浓度, mg/mL; c_2 为吸附平衡后待分离物残留在溶液中的质量浓度, mg/mL; V 为溶液体积, mL; m 为树脂质量, g。

选择性分离系数

$$\alpha_{\frac{\text{L-赖氨酸}}{\text{L-哌啶甲酸}}} = \frac{q_{\text{L-赖氨酸}} \times c_{\text{L-哌啶甲酸}}}{q_{\text{L-哌啶甲酸}} \times c_{\text{L-赖氨酸}}} \quad (2)$$

式中: $q_{\text{L-赖氨酸}}$ 和 $q_{\text{L-哌啶甲酸}}$ 分别为 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸在树脂上的吸附量, mg/g; $c_{\text{L-赖氨酸}}$ 和 $c_{\text{L-哌啶甲酸}}$ 分别为吸附平衡后 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸残留在溶液中的浓度, mg/mL。

1.3.3 D103-MTBE 催化树脂的动态吸附-洗脱装柱: 将层析柱洗净, 底部填以少量脱脂棉, 将预处理后的 D103-MTBE 催化树脂转移至层析中; 层析柱中的液面始终高于树脂约 1 cm。吸附-洗脱: 待分离样品以 1 mL/min 的流速流入并通过层析柱。当样品即将流完时, 0.04% (v/v) 氨水溶液以 0.4 mL/min 的速度流入层析柱, 用自动收集器收集洗脱液。

2 结果

2.1 检测方法的加样回收率

如表 1 所示, L-哌啶甲酸和 L-赖氨酸的回收率分别为 99.04% 和 98.78%, 说明实验所用检测方法具有较好的重复性, 且准确度较高, 适用于体系中 L-哌啶甲酸和 L-赖氨酸含量的分析检测。

表 1 检测方法的加样回收率检验

项目	试样测定值 (mg)	加标量 (mg)	加标试样测定值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
L-哌啶甲酸	0.11	0.21	0.31	96.88	99.04
	0.11	0.44	0.56	101.82	
	0.11	0.63	0.73	98.65	
	0.11	0.72	0.82	98.80	
	0.12	0.19	0.30	96.77	
L-赖氨酸	0.12	0.33	0.44	97.78	98.78
	0.12	0.65	0.76	98.70	
	0.12	0.42	0.55	101.85	

2.2 树脂性能比较

表 2 所示为不同树脂对 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的吸附能力。WA-3 氨基酸专用树脂、D001 阳离子交换树脂、D113 阳离子交换树脂、D002 阳离子交换树脂对 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的选择性系数 α 均约为 1, 无法实现 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的完全分离。D103-MTBE 催化树脂对 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的选择性系数 α 能达到 2.153, 可以有效分离 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸。

表 2 不同树脂的 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸吸附能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

树脂	吸附量 q(mg/g)		选择性系数 $\alpha(-)$
	L-赖氨酸	L-哌啶甲酸	L-赖氨酸/L-哌啶甲酸
WA-3	191 ± 12	182 ± 11	1.013 ± 0.02
D001	220 ± 5	203 ± 12	0.945 ± 0.01
D113	195 ± 11	189 ± 8	0.984 ± 0.02
D002	207 ± 8	214 ± 12	1.055 ± 0.06
WS-3	114 ± 14	123 ± 10	1.532 ± 0.03
D103-MTBE	170 ± 12	131 ± 4	2.153 ± 0.03

2.3 D103-MTBE 催化树脂的吸附动力学曲线

准确称取 D103-MTBE 树脂 6 g, 加入 20 mL L-哌啶甲酸转化液, 并在 25 °C 恒温振荡。每隔 2 min 取样, 测定溶液中 L-哌啶甲酸、L-赖氨酸和磷酸盐浓度, 计算吸附量, 得到的吸附动力学曲线如图 1 所示。L-哌啶甲酸在 D103-MTBE 树脂上, 25 °C 最大吸附量为 132 mg/g, 吸附 6 min 左右达到平衡; 相同条件下的 L-赖氨酸最大吸附量为 175 mg/g, 但是在吸附 10 min 后才达到平衡; 磷酸盐在的 D103-MTBE 树脂上吸附量小于 10 mg/g。

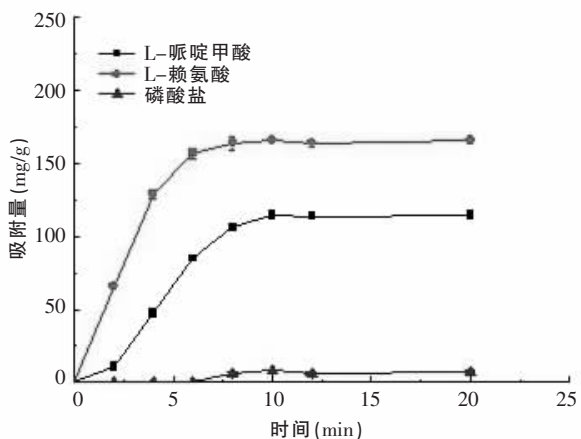


图 1 D103-MTBE 树脂对 L-赖氨酸、L-哌啶甲酸和磷酸盐的吸附曲线

2.4 温度对 D103-MTBE 树脂吸附 - 洗脱的影响

准确称取 D103-MTBE 树脂 6 g, 加入 20 mL 含有全细胞转化液, 分别在 25、35、45、55 °C 恒温振荡, 使其达到饱和和吸附, 吸取上层液体测定 L-哌啶甲酸、L-赖氨酸和磷酸盐浓度, 计算吸附量; 分离树脂, 吸干表面水分, 对应加入浓度为 0.04% (v/v) 氨水各 20 mL 后再不同温度下进行振荡洗脱 2 h, 然后滤出, 测定洗脱液中 L-哌啶甲酸、L-赖氨酸和磷酸盐浓度, 计算回收率 (回收率 = 100% × 洗脱质量/吸附质量)。结果表明, 25 ~ 35 °C 有利于 L-哌啶甲酸吸附。当吸附温度高于 35 °C 时, 虽然 L-哌啶甲酸在

D103-MTBE 树脂上的吸附量大幅度下降, 但洗脱后得到的产品回收率增加, 故上柱后的动态吸附 - 洗脱过程选择使用 35 °C 作为吸附温度。见图 2、图 3。

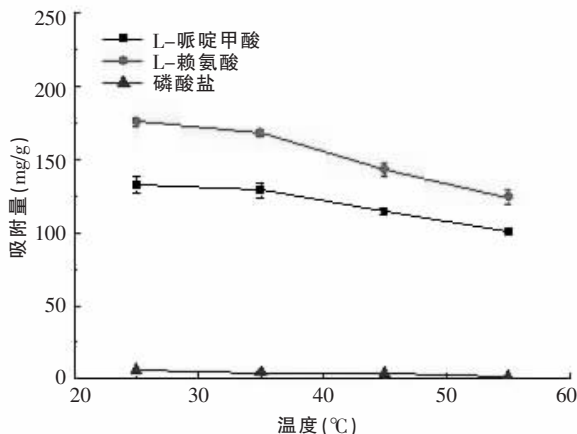


图 2 温度对 D103-MTBE 树脂吸附 L-哌啶甲酸、L-赖氨酸和磷酸盐的影响

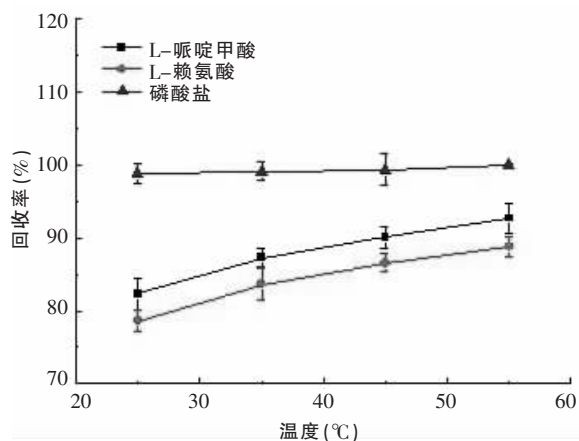


图 3 温度对 D103-MTBE 树脂洗脱回收 L-哌啶甲酸、L-赖氨酸、磷酸盐的影响

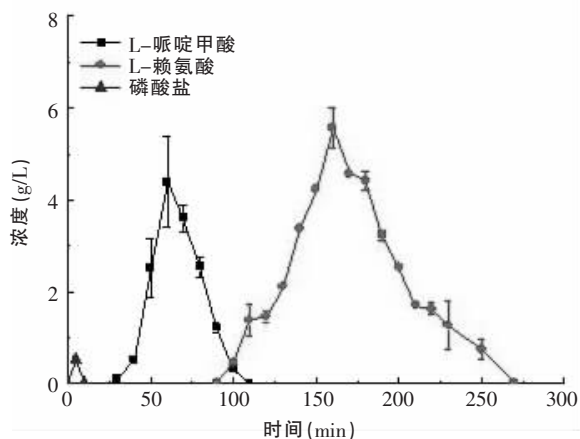


图 4 L-赖氨酸、L-哌啶甲酸和磷酸盐在 D103-MTBE 催化树脂的洗脱曲线

2.5 D103-MTBE 催化树脂的动态吸附 - 洗脱

整个动态吸附 - 洗脱过程中, 树脂表面湿润、无气泡。每 5 min 收集一管洗脱液, 当洗脱液中无 L-

哌啶甲酸、L-赖氨酸、磷酸盐检测出时洗脱完成。D103-MTBE 催化树脂的洗脱曲线如图 4 所示。洗脱曲线中,磷酸盐与 L-哌啶甲酸、L-赖氨酸均无重叠峰,可以完全分离;L-哌啶甲酸与 L-赖氨酸的重叠峰较少。洗脱时间为 30 ~ 80 min 时,收集的 L-哌啶甲酸纯度最高,得到的 L-哌啶甲酸回收率为 96.33%。故 D103-MTBE 催化树脂可用于微生物转化液中的 L-哌啶甲酸分离提纯。

3 讨论

目前 L-哌啶甲酸的分离方法主要包括化学手性拆分和浓酸水解等^[13-14],而这些过程所需的手性拆分剂价格高,浓酸易腐蚀设备和造成环境污染。本研究首次针对 L-哌啶甲酸的细胞培养液体系,建立 L-哌啶甲酸的树脂分离方法。

筛选出对目标产品选择性系数高的树脂是增加树脂分离效果的重要因素。离子交换树脂法目前常被用于氨基酸(如 L-赖氨酸)的分离过程^[15]。但是,本研究结果显示,离子交换树脂对 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的选择性系数均约为 1,无法实现 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的完全分离。103-MTBE 催化树脂对 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的选择性系数却能达到 2.153,有利于两种物质分离。

确定树脂分离的参数指标是实现产品工业化生产的必需条件。本研究中,针对微生物细胞液中的 L-哌啶甲酸分析其分离影响因素,最终获得的 L-哌啶甲酸最大回收率为 96.33%。L-哌啶甲酸在 103-MTBE 催化树脂上的解吸过程温和,使用性能稳定,具有连续分离操作潜力。因此,催化树脂分离可以作为 L-哌啶甲酸分离过程产业化的有效方法。

总之,本研究首次筛选出适用于微生物全细胞转化液中 L-哌啶甲酸提纯的树脂 D103-MTBE 催化树脂。D103-MTBE 催化树脂对 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸的选择性系数 α 能达到 2.153,可以有效分离 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸;在 35 °C、20 × 380 mm 层析柱、1 mL/min 上样流速、0.04% (v/v) 氨水洗脱液和 0.4 mL/min 洗脱液流速的条件下,L-哌啶甲酸的回收率为 96.33%。本方法适用于生物转化液中 L-哌啶甲酸的提纯,对哌啶类物质的分离提纯具有指

导意义。

参考文献

- [1] Ghorai MK, Halder S, Das RK. Domino imino-aldol-aza-Michael reaction: one-pot diastereo- and enantioselective synthesis of piperidines [J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2010, 75(75): 7061 - 7072.
- [2] Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, et al. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70S6 kinase [J]. *Nature*, 1992, 358: 70 - 73.
- [3] Pastuszak I, Molyneux RJ, James LF, et al. Lentiginosine, a dihydroxyindolizidine alkaloid that inhibits amyglucosidase [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(7): 1886 - 1891.
- [4] 米乐. 大肠杆菌合成 L-哌啶甲酸的代谢工程研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2017.
- [5] Cant AA, Sutherland A. Asymmetric synthesis of pipercolic acid and derivatives [J]. *Synthesis*, 2012, 44: 1935 - 1950.
- [6] Wilkinson TJ, Stehle NW, Beak P. Enantioselective Syntheses of 2-Alkyl- and 2, 6-Dialkylpiperidine Alkaloids: Preparations of the Hydrochlorides of (-)-Coniine, (-)-Solenopsin A, and (-)-Dihydropinidine [J]. *Organic Letters*, 2000, 2(2): 155 - 158.
- [7] Fujii T, Aritoku Y, Agematu H, et al. Increase in the Rate of L-Pipercolic Acid Production Using *lat*-Expressing *Escherichia coli* by *lysP* and *yeiE* Amplification [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(9): 1981 - 1984.
- [8] Ying HX, Wang J, Wang Z, et al. Enhanced conversion of L-lysine to L-pipercolic acid using recombinant *Escherichia coli* containing lysine cyclodeaminase as whole-cell biocatalyst [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 117: 75 - 80.
- [9] 陈震. 多羟基哌啶类和吡咯烷类化合物的合成研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 1999.
- [10] 陈可泉, 何珣, 叶峰, 等. L-哌啶甲酸的分离方法 [P]. 中国, CN 104803909 B. 2017. 8. 29.
- [11] Yang Y, Yuan XH, Xu YQ, et al. Purification of anthocyanins from extracts of red raspberry using macroporous resin [J]. *International Journal of Food Properties*, 2015, 18(5): 1046 - 1058.
- [12] 黄波, 李永生. 离子交换法分离赖氨酸和组氨酸的研究 [J]. *应用化工*, 2008, 37(5): 536 - 538.
- [13] 应忠华, 任闻, 贾廷尧, 等. 一种 (S)-3-哌啶甲酸的制备方法 [P]. 中国, CN 106831540 B. 2019. 06. 11.
- [14] Clement JL, Leverett P, Vagg RS, et al. A convenient resolution of pipercolic acid using a metal complex as the chiral auxiliary [J]. *Journal of Coordination Chemistry*, 2006, 60(16): 1789 - 1794.
- [15] 司文青. 离子交换树脂法分离纯化赖氨酸的研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2017.

(收稿日期: 2019-12-16)

学术编辑: 董军)