

微反应器在酶催化合成哌啶甲酸中的研究

张 瑞, 曹 逊, 应晗笑, 刘泽蒙, 陈可泉*

(南京工业大学 生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816)

摘要: 哌啶甲酸是哌啶环衍生物的重要前体。赖氨酸环化脱氨酶可以催化 L-赖氨酸生产 L-哌啶甲酸。为加快赖氨酸环化脱氨酶的催化反应速率, 设计并制作了 PDMS 微芯片作为反应装置, 并研究了微通道尺寸、微通道长度和反应液流速对反应速率的影响。在微反应器中最佳反应条件是: 微通道尺寸 200 μm ; 微通道长度 128.4 cm; 反应液流速 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。在优化的条件下反应 44 h, 获得哌啶甲酸 2.22 g/L, 比在摇管中反应所需时间缩短了 1/3。

关键词: 哌啶甲酸; PDMS 微芯片; 赖氨酸; 赖氨酸环化脱氨酶; 酶催化

中图分类号: Q 503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)03-0262-06

Application of Micro Reactor in Pipecolic Acid Synthesis through Enzymatic Catalysis

ZHANG Rui, CAO Xun, YING Hanxiao, LIU Zemeng, CHEN Kequan*

(Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, China)

Abstract: Pipecolic acid is an important precursor for piperidine ring derivatives. A lysine cyclodeaminase was used to catalyze L-lysine for L-pipecolic acid synthesis. To accelerate the catalytic rate, a PDMS microchip was designed and fabricated. Effects of microchannel size, microchannel length and liquid flow rate on catalytic rate were studied. The optimized conditions in microreactor were: microchannel size 200 μm ; microchannel length 124.8 cm; and liquid flow rate 100 $\mu\text{m}/\text{min}$. Under the optimized conditions, a pipecolic acid titer of 2.22 g/L was obtained after 44 h reaction, the reaction time reduced 1/3 in comparison with the reaction in shaking tube.

Keywords: pipecolic acid, PDMS microchip, lysine, lysine cyclodeaminase, enzyme catalytic

哌啶甲酸(Pipecolic acid, 简称 PA)是一种刚性环状非蛋白质氨基酸, 可以作为多种化合物合成库中的多功能骨架^[1]。哌啶甲酸或其衍生物可以广泛用作许多手性药物和生物活性物质的合成中间体^[2], 如抗癌药物雷帕霉素、局麻药物布比卡因、新一代

抗生素山卓霉素、抗 HIV 药物斑莩素以及抗抑郁药物哌苯甲醇等^[3]。由于哌啶甲酸及其衍生物独特的生物性能和重要的利用价值^[4], 其合成制备引起了国内外越来越多的研究者的关注^[5]。

目前, 哌啶甲酸的合成方法主要有化学不对称

收稿日期: 2015-10-12

基金项目: 国家 863 计划项目(2015AA021005); 江苏省产学研联合创新基金项目(BY2014005-07)。

* 通信作者: 陈可泉(1982—), 男, 江苏南京人, 工学博士, 讲师, 博士研究生导师, 主要从事生物过程工程与系统工程领域的研究工作。

E-mail: kqchen@njtech.edu.cn

引用本文: 张瑞, 曹逊, 应晗笑, 等. 微反应器在酶催化合成哌啶甲酸中的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(03): 262-267.

合成、光催化合成以及生物催化合成三种方法^[6-8]。其中化学合成法步骤比较繁琐,且过程中会产生一些对环境有毒害的副产物^[9]。光催化合成对催化条件和反应器的要求比较苛刻,反应过程难以控制^[10]。酶法合成相比非生物催化剂具有高效性、专一性等特点,使得生物合成法相比其他方法更加环保、高效^[11]。

微流控技术是在微尺寸的条件下对复杂流体进行控制、操作和检测的新兴技术^[12-14]。相比于在摇瓶或其他反应器^[15],流体在微纳尺度下,流体间的传质、传热^[16]和反应过程变得高效、易控^[17],极大提高了反应的可控性^[18]。利用这一优势,微流控技术已逐渐应用于生物催化中^[19-21]。Kundu 等在微通道中用酶催化 ϵ -己内酰胺合成聚己内酯,快速合成了大分子聚己内酯^[22]。Kanno 等在 PDMS 微通道中用 β 糖苷酶水解 PNPGal,比试管中进行的反应速率加快了 5 倍^[23]。Heider 等用组合式微反应器合成小分子药物阿利吉仑,达到 41 g/L 的高产量^[24]。

作者采用赖氨酸环化脱氨酶 (Lysine cyclodeaminase, 简称 LCD) 催化 L-赖氨酸生成 L-哌啶甲酸^[25],见图 1。在催化过程中底物进入酶活性中心较慢,采用自制 PDMS 微芯片作为反应器强化传质,提高反应速率。

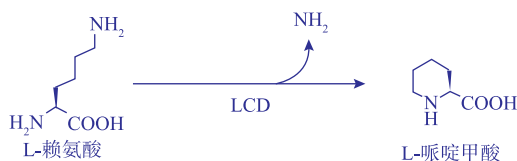


图 1 L-赖氨酸经 LCD 制备 L-哌啶甲酸工艺

Fig. 1 Conversion of L-lysine to L-pipecolic acid by LCD

1 材料与方法

1.1 材料与设备

聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 聚合物前体及固化剂:购于苏州文灏科技有限公司;L-赖氨酸:购于国药集团化学试剂有限公司;L-高脯氨酸:购于阿拉丁;NaCl、蛋白胨、酵母粉、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠等:购于南京晚晴化玻有限公司。

IKA CVC 3000 真空压力泵进行 PDMS 脱气, GZX-9240 MBE 数显鼓风干燥箱进行 PDMS 的固化, LSP02-1B 双通道注射泵用于微芯片反应, Alltech Series 1500 高效液相色谱用于组分检测。

1.2 赖氨酸环化脱氨酶的培养方法

LB 液体培养基包含蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 5 g/L, 一定浓度的氨苄抗生素。种子培养方法是先将含有 *pipA* 基因的 *E.coli* 工程菌株接种于 5 mL 的 LB 液体培养基中, 加入 10 μ L 的氨苄抗生素。置于 37 $^{\circ}$ C 摇床, 转速 200 r/min 过夜培养。将种子液用于发酵培养, 在 500 mL 的摇瓶中接种 1 mL 上述种子液于 100 mL 的 LB 液体培养基中, 加入 200 μ L 的氨苄抗生素培养 2.5~3 h, 在 OD₆₀₀ 值达到 0.6 时加入 IPTG, 于 30 $^{\circ}$ C 摇床中诱导表达 6 h。

1.3 赖氨酸环化脱氨酶粗酶液制取

将诱导后的发酵液在 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。加入 40 mL、pH 7.0 PBS 缓冲液进行重悬菌体洗涤, 再以相同条件离心。洗涤两次后, 将菌体重悬于 1/10 体积的 pH 7.0 PBS 缓冲液超声破碎, 超声破碎功率 150 W、时间 20 min、时间间隔 (工作时间: 间歇时间) 2:2 (s/s)。超声破碎结束后的浑浊液 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 即获得赖氨酸环化脱氨酶粗酶液。

1.4 Bradford 考马斯亮蓝法测定蛋白质质量浓度

取两支干净的试管, 一支加入 PBS 缓冲液 1 mL 及 Bradford 4 mL, 作为空白组。另一支加入稀释到合适浓度的酶液 1 mL 及 Bradford 4 mL, 混匀并室温静置 5 min, 用紫外分光光度计测定样品在 595 nm 下的吸光度值, 得到样品中的蛋白质质量浓度。

1.5 L-赖氨酸和 L-哌啶甲酸测定

使用高效液相色谱进行含量测定。色谱柱为 C18 分析柱 (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm)。流动相 A 为 7 mL/L 三氟乙酸和 5 mmol/L 七氟丁酸的水溶液, 流动相 B 为乙腈。进样体积 10 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 用蒸发光散射检测器检测。检测器温度 115 $^{\circ}$ C, 使用自动空气发生器作为气源, 空气流速 3 L/min。

1.6 微芯片制作

微流控芯片的结构见图 2a。制作 PDMS 芯片的模具由苏州文灏芯片科技有限公司制作。本次制作的“S”型通道总长度为 31.2 cm, 尺寸为 200~400 μ m, 通道深宽比为 1:1。

硅片模具上的光刻胶易脱落, 因此使用甲基硅氧烷对硅片模具进行表面修饰。将硅片模具放入玻璃挥发缸中, 滴入甲基硅氧烷 2~3 滴, 使其挥发修饰 3 min。

将 PDMS 聚合物前体和固化剂按质量比 10:1

混合后充分搅拌,置于自制的小型密闭容器中,使用真空泵抽气。利用狭小空间实现快速脱气,除去混合物中的气泡,这个过程需要 20~30 min,比常用的脱气装置缩短了大量时间。脱气完成后将其小心浇注在硅片模具上,于 80 °C 烘箱静置 20 min。整个过程需要大约 1 h。待 PDMS 固化后将其小心剥离,竖直打孔后,再与另一块平整的 PDMS 贴合,于 60 °C 烘箱静置 3 h 完成键合。

1.7 摇管中进行赖氨酸环化脱氨酶的催化

向磷酸盐缓冲液中加入赖氨酸,使其质量浓度为 10 g/L,再加入粗酶液至蛋白质质量浓度 1 g/L 和一定量的 NAD^+ 与 Fe^{2+} ,用乙酸调节体系 pH 到实验所需,配制成赖氨酸环化脱氨酶催化反应体系。

向 10 mL 摇管中加入反应液,放置在恒温振荡摇床中,转速 250 r/min 进行催化反应。

1.8 在微芯片中进行赖氨酸环化脱氨酶的催化

反应体系与 1.7 所述相同。用注射器吸取反应液,排出注射器前端空气,然后固定在注射泵上。用硅胶导管连接注射器、微芯片和反应液收集管。通过调节注射泵的注射速度控制反应液流速,向微芯片中注入反应液进行反应。用电子控温板控制微芯片的温度。反应流程示意图见图 2(b)。通过注射泵的“推-拉”进行反应液在微通道中的循环反应。

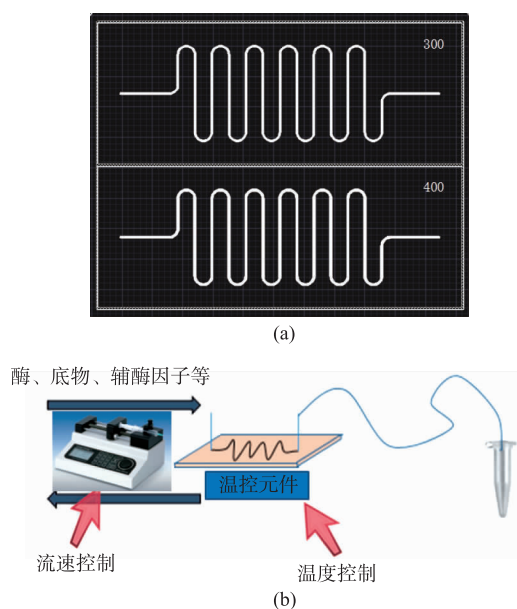


图 2 “S”型通道形状以及反应流程

Fig. 2 S-shape channel and the reaction process

2 结果与讨论

2.1 赖氨酸环化脱氨酶的催化特性

为研究赖氨酸环化脱氨酶的催化性质,首先在摇管中对影响赖氨酸环化脱氨酶的催化活力的几个重要因素进行了研究。影响赖氨酸环化脱氨酶催化反应的主要条件有底物浓度、pH、辅酶 NAD^+ 添加和 Fe^{2+} 等。作者分别对其进行了研究,结果见图 3。其中图 3(a)是不同底物浓度得到的产量曲线,图 3(b)、图 3(c)和图 3(d)为不同催化条件下反应 72 h 后测得的产量。

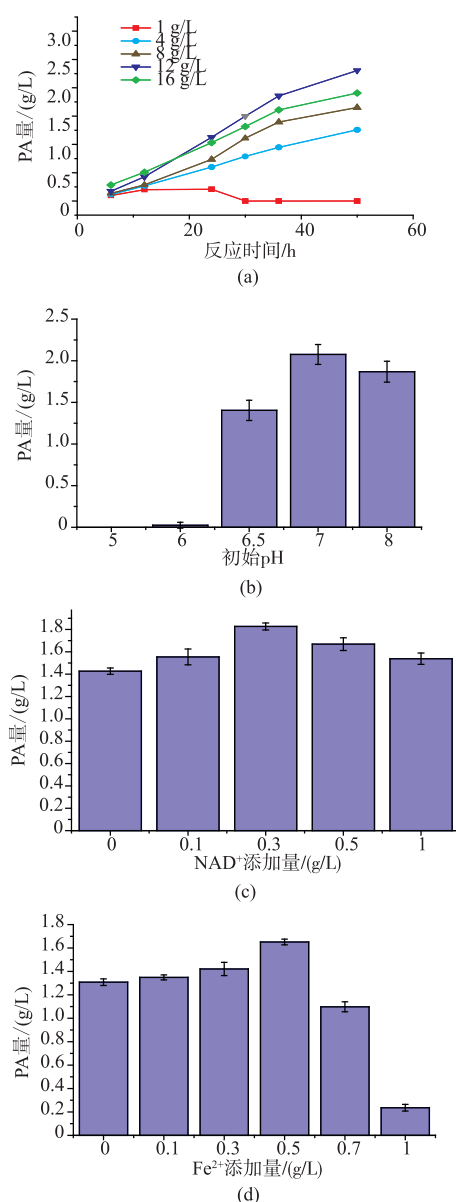


图 3 赖氨酸环化脱氨酶的催化特性

Fig. 3 Characteristic of lysine cyclodeaminase

从图 3(a)可以看出,初始赖氨酸质量浓度最佳条件是 12 g/L。赖氨酸质量浓度过低时不易得到产物积累,而赖氨酸质量浓度太高会对酶催化产生底物抑制作用。如图 3(b)所示,pH 高于 6.5 时,能得到产物积累,其中 pH 为 7 是最佳催化条件。pH 低于 6 时由于酶易失活,酶催化不能进行。赖氨酸环化脱氨酶作用时候会结合 NAD^+ 作为辅因子。不同于细胞内本身代谢就会产生游离的 NAD^+ , 游离酶所在的体系中需要添加一定的 NAD^+ , 作者对此进行了实验,发现 0.3 g/L 是最佳 NAD^+ 添加量,同时发现体系中加入 0.5 g/L 的 Fe^{2+} 会较多的提升哌啶甲酸产量,而过多的 Fe^{2+} 会抑制赖氨酸环化脱氨酶的活性,见图 3(c)和图 3(d)。因此,LCD 酶催化赖氨酸合成哌啶甲酸的摇管最佳反应条件为底物质量浓度 12 g/L,初始 pH 为 7, NAD^+ 添加 0.3 g/L, Fe^{2+} 添加 0.5 g/L。反应约 66 h 结束,L-哌啶甲酸产量达到 2.2 g/L。

2.2 微芯片各条件对于赖氨酸环化脱氨酶催化速率的影响

2.2.1 微通道尺寸对哌啶甲酸产量的影响 微通道尺寸是影响流体反应的一个重要因素。制作了通道尺寸为 200、300、400、700、1 000 μm 的微芯片,并分别用其进行了赖氨酸环化脱氨酶催化反应。催化实验反应时间 6 h,反应液流速 40 $\mu\text{L}/\text{min}$,通道长度 31.2 cm,数据见图 4。

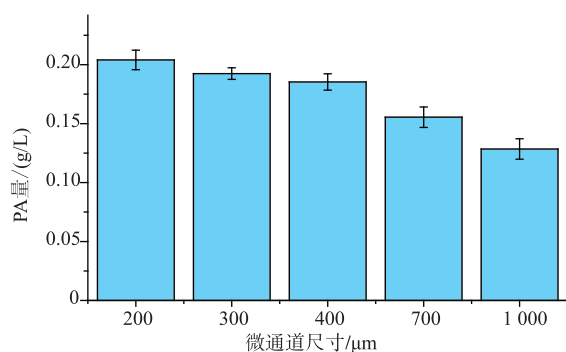


图 4 微通道尺寸对哌啶甲酸产量的影响

Fig. 4 Effect of microchannel size on the yield of PA

由于微通道的尺寸直接决定了反应液流体的性质,因此微通道的尺寸会对酶的催化速率产生重要的影响。当微通道的尺寸缩小到一定程度时,流体中的界面效应会发生明显增大的现象,各组分中的分子由布朗运动而产生的传质效果也显著增强,使酶分子与赖氨酸更容易接触,促进催化反应的进

行。从图 4 可以发现,尺寸为 1 000 μm 的通道内酶催化速率慢,当微通道尺寸缩小后,催化速率显著加快。当微通道尺寸减小到 400 μm 以内,尺寸效应变得不再那么明显。尺寸 200 μm 的通道内的催化速率较 300 μm 和 400 μm 的通道稍高一些。反应 6 h 后产量达到 0.20 g/L,比摇管中对照反应所得增加了 19.9%。

2.2.2 微通道长度对哌啶甲酸产量的影响 微通道的长度是指构成通道的几何图形的总长度,本次实验所设计的微通道长度通过 AutoCAD 来进行准确测定,总长为 31.2 cm。作者研究了微通道长度对哌啶甲酸产量的影响,利用不同长度的 200 μm 尺寸的 PDMS 微通道进行酶催化反应。催化实验反应时间 6 h,反应液流速 40 $\mu\text{L}/\text{min}$,产量见图 5。

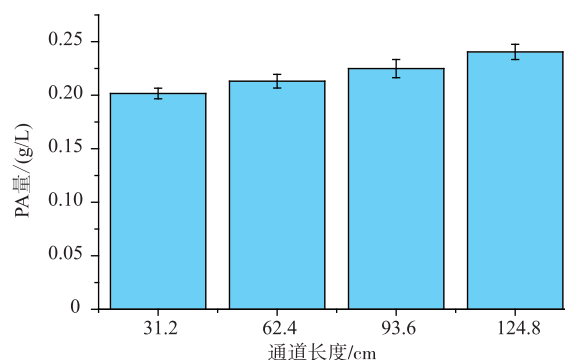


图 5 微通道长度对哌啶甲酸产量的影响

Fig. 5 Effect of microchannel length on the yield of PA

本次实验设置了 4 个微通道长度,分别是 31.2、62.4、93.6、124.8 cm,实验中使用多个通道串联以增加微通道长度。由图 5 可以发现微通道越长,微通道对于酶的催化反应的作用越为明显。微通道长度决定了反应液在微通道里面的滞留时间,微通道的延长使酶与底物结合的机会变大。由图 5 可以得出长度 124.8 cm 的微通道为最适条件,此条件下催化反应进行 6 h 后,得到了 0.24 g/L 的产物,产量比摇管中的反应增加了 40.3%。

2.2.3 微芯片中反应液流速对哌啶甲酸产量的影响 在微芯片反应中,反应液流速也是一个对酶催化效率产生重要影响的条件。在一定尺寸、形状的容器内,流体流速是影响各组分传质速率的最大因素,流速越快,流体间的传质速率也会越快。在本次实验,反应液流速还决定了反应液循环反应过程中进入微通道的次数。由于 PDMS 微芯片的耐压能力

有限,因此不能无限制的增加流速,否则会因为高流速带来的过高压力破坏微通道内部已键合的结构,导致微芯片中的流体发生泄漏的现象。作者研究了微芯片中反应液流速对哌啶甲酸产量的影响,进行了 20~100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 5 个不同流速下的酶催化反应,结果见图 6。本次实验使用尺寸 200 μm 的 PDMS 微芯片,反应时间 6 h,通道长度 31.2 cm。

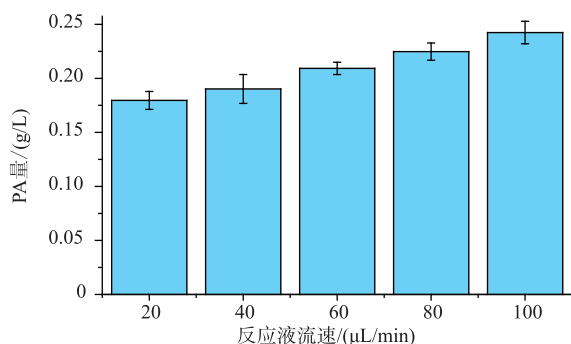


图 6 反应液流速对哌啶甲酸产量的影响

Fig. 6 Impact of current speed on the yield of PA

随着反应液流速的增加,酶催化速率明显提升。流体流速的增加使其中各组分传质更快,酶和底物有更多机会结合。考虑到 PDMS 芯片的耐压能力,本次实验将最高流速设置为 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。当流速为 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,反应 6 h 得到的产量是 0.24 g/L ,比摇管中反应得到的产量多 42.1%。

2.3 酶在微芯片与摇管中催化效率的对比

经过对赖氨酸环化脱氨酶催化条件和微芯片中反应条件的研究,用优化后的条件分别在摇管和微芯片中进行了酶催化反应。本次实验采用尺寸 200 μm ,长度 124.8 cm 的微通道,用 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速进行反应,每隔 6 小时取样进行反应物赖氨酸和产物哌啶甲酸质量浓度的测定,结果见图 7。其中 4 条曲线分别代表各个时刻微芯片和摇管中的赖氨酸和哌啶甲酸含量的变化趋势。

酸和哌啶甲酸含量的变化趋势。

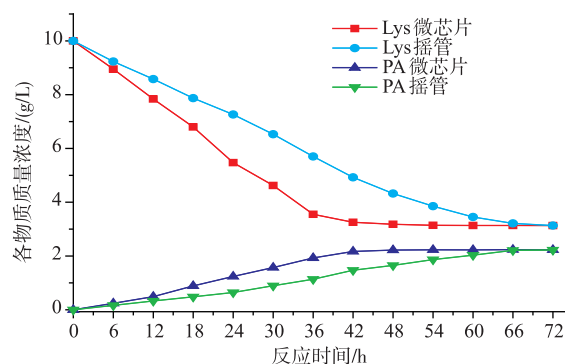


图 7 微芯片和摇管中的反应过程

Fig. 7 Whole reaction in microchip and shaking tube

在微芯片中进行的酶催化反应,赖氨酸消耗速率和哌啶甲酸生产速率都快于摇管中的反应。在反应约 44 h 时,微芯片中的反应到达平衡状态,此时产物质量浓度为 2.22 g/L ,底物赖氨酸也不再消耗。摇管中进行的反应在 66 h 时达到平衡,哌啶甲酸的产量为 2.22 g/L ,与微芯片中酶催化所得的产量一致。实验结果表明,在微芯片中的酶催化反应比摇管提前 22 h 完成,整体缩短了 1/3 的反应时间。

3 结 语

作者设计了一个简单的“S”型微芯片,用自制装置实现快速脱气完成 PDMS 固化来制作 PDMS 微芯片,用于加速赖氨酸环化脱氨酶催化 L-赖氨酸产生 L-哌啶甲酸。赖氨酸环化脱氨酶催化速率较慢,作者对 pH、温度及辅因子添加等催化条件进行了一定优化,并着重于探索如何使用微芯片加速酶的催化。最终使用尺寸为 200 μm ,通道长度为 124.8 cm 的微芯片,反应液流速设置为 100 $\mu\text{L}/\text{min}$,反应 44 h 后达到平衡。相比摇管中反应 66 h 反应平衡,缩短了 1/3 的反应时间。

参考文献:

- [1] KENTO K, YASUHIRO S, KEI M, et al. Refined regio- and stereoselective hydroxylation of L-pipecolic acid by protein engineering of L-proline cis-4-hydroxylase based on the X-ray crystal structure[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(4): 383-392.
- [2] LI Yunbo, TANG Fengxiang, MENG Chun, et al. Progress in the synthesis and application of nipecotic acid and its derivatives[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2009, 29(7): 1068-1081. (in Chinese)
- [3] LI Zhendong, FAN Jun, ZHANG Zongwei, et al. Advances in the synthesis of pipecolic acid and derivatives[J]. *Chemistry*, 2006, 69, w074. (in Chinese)
- [4] MAKOTO S, ATSUSHI Y, TAKATO K, et al. Nucleophilic addition reaction to the iminium salts generated from pipecolic acid derivatives and application to the synthesis of bicyclic compounds[J]. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 2015, 4(2): 129-131.

- [5] SUKHDEV S,CLAIRE M M,SANDRINE C V,et al. Synthesis and conformational analysis of fluorinated pipecolic acids[J]. **Synlett**,2012,16:2421-2425.
- [6] YASUSHI T,RYOMA M,RYOICHI Y,et al. Functional expression of L-lysine alpha-oxidase from *Scomber japonicus* in *Escherichia coli* for one-pot synthesis of L-pipecolic acid from DL-lysine [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2015,99(12):5045-5054.
- [7] WILKINSON T J,STEHLE N W,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**,2000,2:155-158.
- [8] PAL B,IKEDA S,KOMINAMI H,et al. Photocatalytic redox-combined synthesis of L-pipecolinic acid from L-lysine by suspended titania particles: effect of noble metal loading on the selectivity and optical purity of the product [J]. **Journal of Catalysis**,2003,217:152-159.
- [9] CHAVAN S P,KHAIRNAR L B,PAWAR K P,et al. Enantioselective syntheses of (R)-pipecolic acid, (2R,3R)-3-hydroxypipecolic acid, beta-(+)-conhydrine and (-)-swainsonine using an aziridine derived common chiral synthon[J]. **RSC Advances**,2015,5(62):50580-50590.
- [10] MOLINARI R,ARGURIO P,LAVORATO C,et al. Review on reduction and partial oxidation of organics in photocatalytic (membrane) reactors[J]. **Current Organic Chemistry**,2013,17(21):2516-2537.
- [11] GATTO G J,BOYNE M T,KELLEHER N L,et al. Biosynthesis of pipecolic acid by RapL, a lysine cyclodeaminase encoded in the rapamycin gene cluster[J]. **Journal of the American Chemical Society**,2006,128(11):3838-3847.
- [12] MARK D,HAEBERLE S,ROTH G,et al. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications[J]. **Chemical Society Reviews**,2010,39(3):1153-1182.
- [13] ZHOU J,ELLIS A V,VOELCKER N H,et al. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices[J]. **Electrophoresis**,2010,31(1)SI:2-16.
- [14] BROWN A J,BRUNELLI N A,EUM K,et al. Interfacial microfluidic processing of metal-organic framework hollow fiber membranes[J]. **Science**,2014,345(6192):72-75.
- [15] WEGNER J,CEYLAN S,KIRSCHNING A,et al. Flow chemistry-a key enabling technology for (multistep) organic synthesis[J]. **Advanced Synthesis & Catalysis**,2012,354(1):17-57.
- [16] FROST C G,MUTTON L,et al. Heterogeneous catalytic synthesis using microreactor technology[J]. **Green Chemistry**,2010,12(10):1687-1703.
- [17] SCHEJN A,FREGNAUX M,COMMENGE J M,et al. Size-controlled synthesis of ZnO quantum dots in microreactors[J]. **Nanotechnology**,2014,25(14):145606.
- [18] CHARLOTTE W,PAUL W. Recent advances in micro reaction technology[J]. **Chemical Communications**,2011,47(23):6512-6535.
- [19] ASANOMI Y,YAMAGUCHI H,MIYAZAKI M,et al. Enzyme-immobilized microfluidic process reactors[J]. **Molecules**,2011,16(7):6041-6059.
- [20] VLAKH E G,TENNIKOVA T B. Flow-through immobilized enzyme reactors based on monoliths:II. kinetics study and application[J]. **Journal of Separation Science**,2013,36(6):1149-1167.
- [21] DONG C,WANG K,ZHANG J S,et al. et al. Reaction kinetics of cyclohexanone ammoximation over TS-1 catalyst in a microreactor[J]. **Chemical Engineering Science**,2015,126:633-640.
- [22] KUNDU S,BHANGALE A S,WALLACE W E,et al. Continuous flow enzyme-catalyzed polymerization in a microreactor[J]. **Journal of the American Chemical Society**,2011,133(15):6006-6011.
- [23] KANNO K,MAEDA H,IZUMO S,et al. Rapid enzymatic transglycosylation and oligosaccharide synthesis in a microchip reactor [J]. **Lab Chip**,2002,2:15-18.
- [24] HEIDER P L,C.Born S,Basak S,et al. Development of a multi-step synthesis and workup sequence for an integrated, continuous manufacturing process of a pharmaceutical[J]. **Organic Process Research & Development**,2014,18(3):402-409.
- [25] YING H X,WANG J,WANG Z,et al. Enhanced conversion of L-lysine to L-pipecolic acid using a recombinant *Escherichia coli* containing lysine cyclodeaminase as whole-cell biocatalyst[J]. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**,2015,117:75-80.