

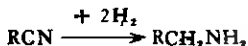
# 腈类化合物生物转化和应用的进展

孙韦强 尹光琳\*

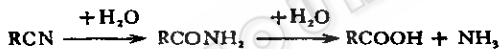
(上海交通大学生物科学与技术系,上海)

腈类化合物是带有氰基的一类有机化合物,它的重要性正逐渐被人认识。1980年法国Jallageas<sup>[1]</sup>对腈的生物转化及其应用进行了全面综述,大量资料表明工业上许多有经济价值的重要有机化合物是由腈类化合物通过化学合成生产的(表1),其化学转化的主要途径有下列三种方式:

## (1) 加氢生成胺



## (2) 酸解或碱解生成酰胺或有机酸



## (3) 碳酸氢盐对 $\alpha$ -氨基腈的作用(Bücherer-Berg反应)

化学反应中加氢需要在高压下进行,所以由腈生产胺是一个相当复杂的工艺。腈水解反应和Bücherer-Berg反应都有以下共同的缺点:在反应过程中形成大量的盐;产物分离困难;反

应需要加热。另外, $\alpha$ -羟基酸和旋光性的氨基酸很难得到。

为了避免上述化学过程的缺点,人们试图用生物法来转化腈。生物法转化腈不仅生成反应产物纯度高,并且反应条件温和(常温常压进行反应)。用生物法能够合成旋光性的 $\alpha$ -羟基酸<sup>[2]</sup>和 $\alpha$ -氨基酸<sup>[3]</sup>。

在讨论腈类化合物生物转化的同时,有必要了解一下生物体中存在的天然的腈类化合物。表2列举了在微生物体中存在的腈类化合物<sup>[1]</sup>。腈类化合物的分离和鉴定是比较困难的,事实上有许多天然的腈类化合物存在并有待发现。天然氰化物和有毒的腈类化合物必须被生物体分解代谢和降解成对细胞代谢没有毒性的普通产物。本文将首先讨论腈类化合物的分解代谢和生物降解,然后介绍利用生物法转化腈

\* 现工作单位:中国科学院上海生物工程实验基地

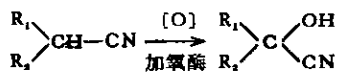
表 1 由腈类化合物生成胺或酸的工业生产过程

腈	反 应	产 品	产品的用途
己二腈 $\text{NC}(\text{CH}_2)_4\text{CN}$	高压加氢 $150^\circ\text{C}$	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$ 己撑二胺	聚合物
丙烯腈 $\text{CH}_2=\text{CHCN}$	酸解, 加热或铜系催化	丙烯酰胺 $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$	聚丙烯酰胺
苯乙腈 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CN}$	酸解, 加热	苯乙酸 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{COOH}$	香料
乳腈 $\text{CH}_3-\text{CH} \begin{matrix} \text{CN} \\ \text{OH} \end{matrix}$ DL	酸解, 加热	DL 乳酸 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ DL	染料, 上漆, 皮革
苯乙醇腈 $\Phi\text{CH} \begin{matrix} \text{CN} \\ \text{OH} \end{matrix}$ DL	酸解, 加热	DL 苯乙醇酸 $\Phi\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{OH} \end{matrix}$	防腐剂
$\alpha$ -羟基- $\gamma$ -甲硫基正丁腈 $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH} \begin{matrix} \text{CN} \\ \text{OH} \end{matrix}$	酸解, 加热	$\alpha$ -羟基- $\gamma$ -甲硫基正丁酸 $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{OH} \end{matrix}$ (DL)	鸡饲料
丙酮氰醇 $(\text{CH}_3)_2\text{C} \begin{matrix} \text{CN} \\ \text{OH} \end{matrix}$	酸解, 加热	$\alpha$ -羟基异丁酸, 然后生成甲基丙烯酸	塑料
$\alpha$ -氨基腈 $\text{RCH} \begin{matrix} \text{CN} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	酸解/碱解, 加热或 (Bücherer-Berg 反应)	$\alpha$ -氨基酸 $\text{RCH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	动物饲料等
$\beta$ -氨基丙腈 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	酸/碱解, 加热	$\beta$ -丙氨酸 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	泛酸的前体
丙二腈 $\text{CH}_2 \begin{matrix} \text{CN} \\ \text{CN} \end{matrix}$	碱解, 加热	丙二酸 $\text{CH}_2 \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{COOH} \end{matrix}$	药剂

类化合物生产有经济价值的有机化合物。

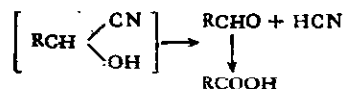
### (一) 腈类化合物的分解代谢和生物降解<sup>[1]</sup>

1. 腈类化合物的  $\alpha$ -羟基化: 腈通过加氧酶氧化生成氰醇:



许多生物体存在着这个氧化途径, 如植物, 真菌, 昆虫, 藻类, 海绵动物, 哺乳动物等。

$\text{RCH}_2\text{CN}$  能被植物转化成羧酸, 这说明腈首先被  $\alpha$ -羟基化, 然后氰醇被分解成醛, 醛进一步被氧化成酸:



3-吡啶乙腈通过小麦组织的代谢作用形成了3-吡啶乙醛证实了这个假设。

2. 由氰醇生成醛: 在氧化腈水解酶或羟基化腈分解酶作用下, 氰醇能够形成醛基和氢氧

表 2 天然存在的腈类化合物<sup>[1]</sup>

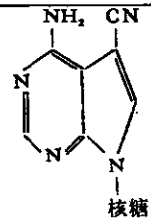
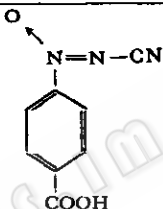
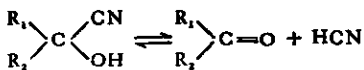
	腈	结构式	微生物
细菌	旺地杀菌素或半加霉素		<i>Streptomyces</i>
真菌	氰葡萄糖苷	$\begin{array}{l} R_1 \\ \diagdown \\ C \\ \diagup \\ R_2 \end{array} \begin{array}{l} \text{CN} \\ \text{O 葡萄糖} \end{array}$	<i>Basidiomycetes</i>
	氰醇	$\begin{array}{l} R_1 \\ \diagdown \\ C \\ \diagup \\ R_2 \end{array} \begin{array}{l} \text{CN} \\ \text{OH} \end{array}$	<i>Basidiomycetes</i>
	$\alpha$ -氨基腈	$R-CH \begin{array}{l} \text{CN} \\ \text{NH}_2 \end{array}$	<i>Basidiomycete W2, Rhizoctonia solani</i>
	炔属腈	$R-C \equiv C-CN$	<i>Clitocybe diataeta, Lepista diemü, L. glaucona</i>
	p-羧基氧化偶氮氰苯		<i>Calvatia lilacina</i>

表 3 固氮酶还原腈类化合物

腈	产物
$R-CN$	$R-CH_3 + NH_3 (R=NH_2, C_2H_5, C_3H_7)$
$CH_2=CH-CN$	$CH_3CH=CH_2 + CH_3-CH_2-CH_3 + NH_3$
$CH_3-CH=CH-CN$ (顺式)	$CH_3-CH_2-CH=CH_2 + CH_3-CH_2-CH_2-CH_3 + CH_3-CH=CH-CH_3$ (顺式) $+ NH_3$
$CH_3-CH=CH-CN$ (反式)	$CH_3-CH=CH-CH_3$ (反式) $+ NH_3$

酸:



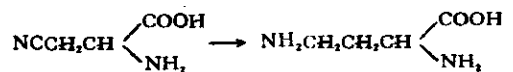
这个反应在真菌、植物和一些昆虫中都有发现,高粱的羟基化腈分解酶已被大量地研究,并已分离纯化。) )

天然的氰醇可以由腈的  $\alpha$ -羟基化或酶水解氰葡萄糖苷形成。

3. 腈类化合物的还原: 固氮酶存在于一些

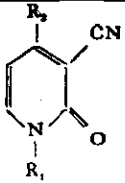
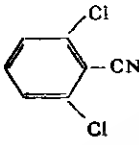
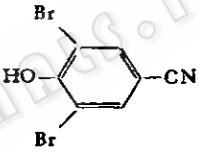
藻类和细菌中,它能还原腈。一些腈能被转化成碳氢化合物(表 2),并释放出  $NH_3$ 。

腈除了被固氮酶还原以外, Ressler 还假设  $\beta$ -氰基丙氨酸能通过酶还原成  $\alpha, \gamma$ -二氨基正丁酸。

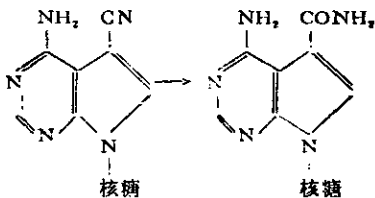


4. 腈类化合物的水解: 水解反应在腈的转化中普遍存在。腈水解形成酰胺而不进一步反

表 4 中间产物为酰胺的腈水解

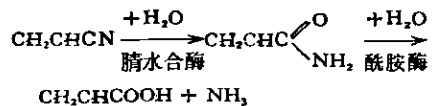
腈	结构式	微生物
脂肪腈 乙腈	$\text{CH}_3\text{CN}$	<i>Corynebacterium nitrilophilus</i> , <i>C. pseudodiphtheriticum</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Nocardia rhodochrous</i>
丙腈 正丁腈 己二腈 丁烯腈	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CN}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CN}$ $\text{NC}(\text{CH}_2)_4\text{CN}$ $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CN}$	<i>N. rhodochrous</i> <i>C. pseudodiphtheriticum</i>
$\alpha$ -羟基腈 乳腈	$\text{CH}_3\text{CH} \begin{cases} \text{CN} \\ \text{OH} \end{cases}$	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>
芳香腈 蓖麻碱类似物		<i>Pseudomonas</i> sp.
苯腈	$\Phi\text{CN}$	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>
二氯苯腈		<i>Trichoderma</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., Soil bacteria
对羟基二溴苯腈		<i>Flexibacterium</i> sp.
$\alpha$ -氨基腈 $\alpha$ -氨基丙腈	$\text{CH}_3\text{CH} \begin{cases} \text{CN} \\ \text{NH}_2 \end{cases}$	<i>Corynebacterium</i> sp.
$\alpha$ -氨基戊腈	$(\text{CH}_2)_3\text{CHCH} \begin{cases} \text{CN} \\ \text{NH}_2 \end{cases}$	<i>Corynebacterium</i> sp.
其它 $\beta$ -氰丙氨酸	$\text{NCCH}_2\text{CH} \begin{cases} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{cases}$	<i>Escherichia coli</i> , <i>Neurospora crassa</i>

应,这类反应是比较少的。例如,龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*) 能转化半加霉素形成桑吉瓦霉素<sup>[1]</sup>:



多数情况下,腈首先形成中间物——酰胺,

然后进一步水解成酸和释放出  $\text{NH}_3$ 。表 4 所列的就是这种类型的转化<sup>[1]</sup>。如丙烯腈在诺卡氏菌腈水合酶的作用下形成中间物丙烯酰胺,然后在酰胺酶的作用下进一步水解成丙烯酸和  $\text{NH}_3$ <sup>[4]</sup>。



另外,腈也能通过腈酶被一步水解形成酸,

这一反应过程被英国的 Harper 所证实, Harper 发现镰刀菌能将苜蓿一步水解成苜蓿酸<sup>[5,6]</sup>。

5. 利用脛的分解代谢途径转化脛类化合物: 从上所述, 利用脛的两个分解代谢途径来转化脛类化合物是可能的。 $\alpha$ -羟基化能够形成旋光的氰醇, 氰醇然后被进一步水解形成相应的 D-或 L- $\alpha$ -羟基化酸。最有经济价值的酸是 L-乳酸, 它可以由丙脛来合成:



可以推测利用生物法转化脛生产有经济价值的重要酰胺化合物和各种酸是大有希望的。事实上, 一些脛要比相应的酸便宜, 如  $\alpha$ -氨基酸, 乳酸, 丙二酸, 丙乙醇酸, 甲基丙烯酸, 苯乙酸,  $\beta$ -丙氨酸,  $\alpha$ -羟基- $\gamma$ -甲硫基正丁酸。这些由生物法生产的酸有几个优点: 产品中盐浓度低; 低能耗; 形成有旋光性的酸。

## (二) 利用生物法转化脛类化合物生产有经济价值的有机化合物

1. 丙烯酰胺的生产: 丙烯酰胺是重要的化工原料, 主要用于生产聚丙烯酰胺。丙烯酰胺的生产工艺早期采用硫酸法, 因存在产品精制困难, 环境污染等问题而被淘汰。近年来, 美国、日本等国采用高效铜系催化剂直接水合法来生产丙烯酰胺, 其优点是反应选择性强, 产物纯度高, 缺点是在高温下进行水合反应。用微生物转化法生产丙烯酰胺不仅产物纯度高, 并能在常温常压下进行反应。1981 年日本的 Watanabe 分离到一株棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) N-774, 此菌株产生组成型脛水合酶, 用聚丙烯酰胺固定化细胞后连续生产丙烯酰胺, 最终积累丙烯酰胺浓度在 30% 左右<sup>[7,8]</sup>。1982 年日本京都大学的山田秀明等人<sup>[9]</sup>分离出一株绿针假单胞菌 (*Ps. chlororaphis*) B-23, B-23 具有很高的脛水合酶活力, 直接用菌体催化丙烯脛时, 反应在 8 小时内直线地进行, 积累丙烯酰胺 400g/l。反应终了时分析表明, 丙烯酰胺产率几乎达 100%, 副产物丙烯酸小于 0.7%。国内现在也有单位在进行这方面的工作, 已分离出一株恶臭假单胞菌 JP-1<sup>[10]</sup>, 当直接

用菌体作催化剂时, 反应 4 小时, 积累丙烯酰胺 20%。产物分析表明, 副产物丙烯酸小于 0.5%, 转化率大于 99%。现在日本日东化学工业公司已在世界上首先建立了一套用固定化细胞连续催化生产丙烯酰胺的工业装置<sup>[11,12]</sup>, 这一生产的成功为生物法生产有机化合物展示了良好的前景。

2. L-丙氨酸的生产: 英国的 Knowles<sup>[13]</sup>利用短杆菌 (*Brevibacterium*) R312 转化  $\alpha$ -氨基丙脛生成 L-丙氨酸。在以葡萄糖为碳源,  $\alpha$ -氨基丙脛为氮源的培养基中培养短杆菌 R312, 用海藻酸钠固定化菌株 R312, 固定化后的脛水解酶的表现米氏常数  $K_m$  为 21mmol/L, 固定化细胞的生命(半衰期)为 45 天, 最终形成的丙氨酸中 87% 是 L 型的。微生物转化法除了生产 L-丙氨酸外, 还能转化  $\alpha$ -氨基- $\gamma$  甲硫基正丁脛生成 L-甲硫氨酸。L- $\alpha$ -氨基丁酸, L-苯丙氨酸, L-缬氨酸和 L-亮氨酸也能用生物法生产。从理论上讲 L-赖氨酸, L-谷氨酸, L-色氨酸等氨基酸也能从相应的  $\alpha$ -氨基脛生产。

3. L- $\alpha$ -羟基酸的生产<sup>[14]</sup>: 在含有 0.02% (w/V) 外消旋的  $\alpha$ -羟基脛 ( $C_3-C_7$ ), 无机盐, 葡萄糖和酵母膏的培养基中接种白球拟酵母培养, 培养 72 小时后离心, 上清液通过二步处理后每升可得 160mg L- $\alpha$ -羟基酸, 产率为 75%。

4. 赖氨酸的生产<sup>[15]</sup>: 赖氨酸通过麦角菌 (*Claviceps purpurea*) 在有机溶剂水溶液中反应 5—10 天后被转化成赖氨酸, 反应产物可用丁醇抽提和提纯。这个工艺过程是比较长的, 但是它能使人人们在通常的条件下得到重要的产物赖氨酸。

## (三) 结语

我们已经讨论的各种生物转化过程有许多共同的特点。如低能耗, 低盐浓度, 没有副产物等。另外, 由于反应是在室温下进行的, 减低了脛的蒸发。这些生物转化过程能够使人们进行有规立构的定向反应, 得到有消旋的化合物, 尤其是  $\alpha$ -氨基酸。受现行技术条件的限制, 用生物转化法生产各种有机化合物在成本上还难以

(下转第 181 页)

(上接第 172 页)

和化学法竞争,但是在现有的基础上作如下几个方面的进一步研究以降低成本是可能的:(1)通过培养条件的改善以及酶合成调节的更好控制以得到廉价的生物催化剂;(2)最适转化条件如温度、pH 等的研究;(3)技术上的改进,主要是固定化细胞和酶技术的改进,以提高固定化细胞和酶的使用寿命,并能以同量的细胞或酶在更短的时间内连续合成大量的酰胺和酸。除此以外,我们还应该充分利用生物转化法的优势,开拓新产品尤其是复杂化合物的研究。

### 参 考 文 献

[1] Jallageas, J. et al.: *Adv. in Biochem. Eng.*, 14: 1—

32, 1980.

[2] Yoshio Fukuda et al.: *J. Ferment. Technol.*, 51(6): 393—397, 1973.

[3] Knowles, J. C. et al.: *Biotechnology Letters*, 7(12): 865—870, 1985.

[4] Watanabe, I. et al.: U. S. Patent, 4, 248, 968, 1981.

[5] Harper, D. B.: *Biochem. J.*, 167: 685—692, 1977.

[6] Harper, D. B.: *Int. J. Biochem.*, 17(6): 677—683, 1983.

[7] Watanabe, I. et al.: U. S. Patent, 4, 390, 631, 1987.

[8] 西川新三等: *化学工学*, 51: 423—431, 1987。

[9] Yamada, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 46(5): 1183—1189, 1982.

[10] 孙韦强等: *分子催化*, 2(2): 119—123, 1988。

[11] Watanabe, I. et al.: U. S. Patent, 4, 421, 855, 1983.

[12] Watanabe, I. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 51(12): 3193—3199, 1987.