

芳香族腈化物的微生物转化

赵爱民* 李文忠 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

腈化物 (Nitriles, R-CN, R 为饱和脂肪烃、烯烃、芳香烃或杂环芳香烃等) 的微生物代谢转化研究, 自 50 年代以来一直作为微生物学研究领域中的一个重要方面而得到广泛的重视。随着利用腈化物的微生物种群的扩大、微生物可利用的腈化物类型的增加及生物工程技术的发展, 对腈化物的微生物代谢、转化及其产物形成和应用的研究已成为国际性的研究热点而迅速发展。

70 年代以来, 国际上特别是日本的研究者, 应用筛选得到的具有高活性脂肪腈水合(解)酶的微生物静止细胞 (Resting cells), 催化水合(解)脂肪腈生产相应的酰胺(羧酸)的研究相当深入, 并成功地用于精细化工产品的工业规模生产中。其中, 应用脂肪腈水合酶 (Nitrile hydratase) 活性菌固定化细胞转化丙烯腈 (Acrylonitrile) 生产丙烯酰胺 (Acrylamide) 就是一个典型的成功例证^[1,2]。另外, 还可从氨基腈 (Amino-nitrile)、羟基腈 (Cyanohydrins) 或酮基腈 (Keto-nitrile) 转化生产光学活性的纯氨基酸^[3]、羧酸^[4]或酮酸^[5]。

腈化物的微生物代谢、转化领域的系统研究工作, 在我国起步较晚, 但也取得了重要的进展。李文忠等在腈化物的微生物代谢转化基础研究和应用开发研究方面做了大量的工作^[6,7], 应用棒杆菌 ZBB-21 (*Corynebacterium* ZBB-21) 的静止细胞催化转化丙烯腈生产丙烯酰胺的研究已接近和达到了当前的国际研究水平。

近年来, 芳香腈和杂环芳香腈的微生物转化研究, 已经发展成为腈化物微生物代谢转化研究中的一个新的主要内容。其典型的转化反应是由 3-氰基吡啶 (3-Cyanopyridine) 转化生产尼克酰胺或尼克酸 (Vitamine pp: Nicotinamide, Nicotinic acid)^[8-10]。但是, 该方面的研究工作在国

内仍属空白。

(一) 腈化物代谢酶系的形成与调控

目前已发现能催化腈化物水解的酶至少有腈水合酶 (脂肪腈水合酶 Aliphatic nitrile hydratase, 芳香腈水合酶 Aromatic nitrile hydratase), 腈水解酶 (脂肪腈水解酶 Aliphatic nitrilase、芳香腈水解酶 Aromatic nitrilase) 及与脂肪腈水合酶共存的脂肪酰胺水解酶 (Aliphatic amidase)。至于芳香酰胺水解酶 (Aromatic amidase) 还未见到报道。

这些酶通常为胞内酶。在有腈化物或酰胺化合物作为唯一碳或碳、氮源生长或作为诱导物时, 可形成诱导性的腈水合(解)酶或酰胺酶。有些菌株则不需诱导物也能合成腈水合(解)酶。

关于某些微生物及霍夫曼棒杆菌 (*Corynebacterium hoffmanii*) ZBB-21 脂肪腈水合酶及与其共存的脂肪酰胺水解酶的形成调控已有报道^[11], 而对芳香腈水合酶及水解酶的形成及其影响因子研究得较少。

Nagasawa 等将应用富集培养技术从土壤中分离到的菌株, 接入含有各种腈化物的培养基中生长, 以洗涤细胞转化 3-氰基吡啶形成尼克酰胺的量为指标。筛选到尼克酰胺形成能力强的玫瑰色红球菌 J₁ (*Rhodococcus rhodochrous* J₁)^[9,12]。对该菌芳香腈水合酶形成条件研究结果表明, 当以丁烯酰胺 (Crotonamide) 为诱导物并有 Co²⁺ 存在时, 在该菌细胞内形成高活性的芳香腈水合酶, 而不呈现芳香腈水解酶的活性。Mathew 等研究玫瑰色红球菌 J₁ 芳香腈水解酶的形成条件, 认为在以异戊腈 (Isovaleronitrile) 为诱导物和存在 Fe²⁺ 时, 菌株表现了极高的芳

* 中国科学院微生物研究所 90 届在读硕士研究生。
国家自然科学基金资助。

腈水解酶活性,使3-氰基吡啶直接转化为尼克酸,而没有尼克酰胺形成^[8,13]。

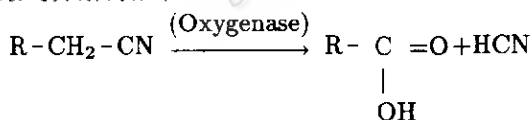
培养基pH是调节酶形成的重要因素之一。我们以棒状杆菌ZBB-21为材料,研究了pH对其脂肪腈水合酶及与之共存的脂肪酰胺水解酶形成及活力比率的影响。至于培养基H⁺浓度对微生物脂肪腈水合酶或水解酶形成及其活力的调控尚未见详细报道。

采用物理或化学因子诱发微生物产生遗传变异,按研究目的定向筛选所需诱变株。该方法在选育铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[14]和野生型短杆菌R312(*Brevibacterium R312*)^[15]脂肪酰胺水解酶缺陷型突变株中得到了成功的应用。但至今尚未见到应用诱变技术调节微生物脂肪腈水合酶或水解酶形成的报道。

(二) 腈化物的微生物代谢途径

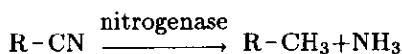
很多微生物能利用腈化物作为碳源或碳氮源生长。微生物对腈的代谢历程随着微生物属种和作为底物的腈化物类型的不同而改变。集大量有关腈的微生物代谢研究资料表明,腈化物的微生物代谢途径呈现了多样性。

腈化物在真菌和藻等微生物加氧酶(Oxygenase)催化下,经 α -氧化形成不稳定中间物,最终分解为醛和HCN^[16]:



(R可为脂肪烃基或芳香烃基)

在细菌及藻固氮酶(Nitrogenase)作用下,腈被还原为相应的烃并释放出NH₃^[16],

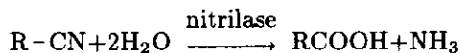


(R可为脂肪烃基或烯基)

当前,研究较多的还是催化腈化物加水的相关酶的酶促转化反应机理。催化腈化物完成加水反应的相关酶类,已报道的有脂肪腈水合酶、脂肪腈水解酶、脂肪酰胺水解酶、芳香腈水合酶和芳香腈水解酶等。

腈化物,包括某些不饱和脂肪族腈、苯基腈及相关的芳香腈和杂环芳腈,可在腈水解酶(脂

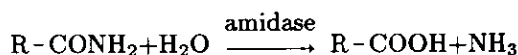
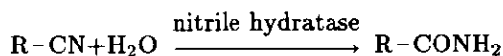
腈水解酶和芳香腈水解酶)催化下加上2克分子水而直接转化为相应的羧酸和NH₃。



(R可为 α 、 β -烯基或芳香基)

该反应途径是由Thimann等^[17]在研究3-吡啶基乙腈及其类似物的水解反应时提出的,尔后,Harper^[18,19]、Yamada^[20]和Bandyopahyay等^[21]在研究脂肪烯基腈化物转化反应时,也证明该反应机制的存在。Mathew等^[8]在应用红球菌J₁研究3-氰基吡啶微生物转化反应时,也发现该化合物在芳香腈水解酶催化下直接生成尼克酸和NH₃,而无酰胺化合物存在。

腈化物的微生物降解大量的是按二步途径进行的。Asano^[22]在研究乙腈微生物水解时,发现节杆菌J₁(*Arthrobacter*)在含乙腈培养基中生长时,在培养液中检出了乙酰胺的存在。虽然在该菌无细胞提取液中检出了相似的腈水解酶活性,但当该酶制剂被纯化后,腈水解酶活性随之消失。为此,Asano认为乙腈是在两种酶联合作用下完成降解反应的,并首次提出各证实存在着一种新酶,所谓的“脂肪腈水合酶”(Aliphatic nitrile hydratase),是由此酶参与并和已描述过的乙酰胺水解酶(Acetamidase)^[22]联合作用,使脂肪腈完成水解反应,也即是脂肪腈水合酶催化加水先形成脂肪酰胺,继而在脂肪酰胺水解酶(Aliphatic amidase)作用下,加水最终形成羧酸和NH₃。



(R可为脂肪烃基或脂肪烯基)

上述两酶共存的连续反应机制,极其广泛地存在于多种腈化物(饱和或不饱和脂肪腈及其取代化合物)的微生物水解反应中。Asano^[23]、李文忠等在研究微生物转化丙烯腈生产丙烯酰胺的过程中,都证明该两步反应途径的存在。

然而,两种酶共存的反应机制并不是对所有腈化物都适用,存在着例外情况。Vematsu^[24]在研究龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*)对丰

加霉素 (Toyocamycin) 的水解反应时, 只检出生成的桑吉瓦霉素 (Sangivamycin), 而无相应的有机酸存在; Theriault 在用青霉菌 (*Penicillium*) 研究 2,2-二苯基-3-(1-吡咯烷基)-丙烯腈水解时, 只得到 2,2-二苯基-3-(1-吡咯烷基)-丙烯酰胺^[25]; Nagasawa^[9] 在用红球菌 J₁ 静止细胞研究 3-氰基吡啶微生物转化时, 在反应液中只积累大量的尼克酰胺而无尼克酸形成。在目前已发表的芳香腈水解反应的研究文献中, 尚未见到有关芳香腈在芳香腈水合酶和与之共存的芳香酰胺水解酶联合催化下, 同时形成芳香酰胺和相应芳香羧酸的报道。由上述结果似乎可以认为, 在某些微生物细胞内只存在着芳香腈水合酶而不能合成芳香酰胺水解酶。但是, 我们近年的研究结果首次证实, 在某些微生物胞内是可以同时合成芳香腈水合酶和芳香酰胺水解酶的 (待发表)。

(三) 催化腈化物水解的相关酶研究

脂肪腈水合酶已从绿针假单胞菌 B23^[1] 和短杆菌 R312^[15] 细胞内分离纯化, 该酶只对低分子量 (3—6 个碳原子) 的脂肪腈显示很高的水合活性。B23 腈水合酶的分子量为 100kDa, 它是由分子量均为 25kDa 的 4 个亚基组成。而 R312 腈水合酶是两种亚基 (分子量分别为 26kDa 和 27.5kDa) 的低聚物, 分子量为 85kDa。Asano^[26] 从节杆菌 J₁ 中纯化得到的乙腈水合酶分子量高达 420kDa, 含有多个分子量分别为 24kDa 和 27kDa 的亚单位。

脂肪酰胺水解酶的纯化及其性质研究已见报道的有短杆菌 R312^[27] 和节杆菌^[28]。节杆菌乙酰胺水解酶是 9 个相同分子量 (39kDa) 的亚基的聚合物, 分子量约为 300kDa, 最适反应温度 55℃, 除乙酰胺外, 丙酰胺和丙烯酰胺均为该酶的适宜底物。

关于脂肪腈水解酶的纯化研究, 至今尚未见报道。但苯腈水合酶已从诺卡氏菌^[18,19]、节杆菌^[21] 和镰孢霉^[29] 细胞中得到。镰孢霉苯腈水合酶是由 37kDa 亚基组成的聚合物, 该酶在溶液中的分子量为 550kDa, 在 pH6—11 范围内稳定, 最适反应温度为 40℃, 可水解脂肪腈, 芳香腈和杂环芳腈, 研究结果表明, 对苯甲腈的

水解速率最大。从诺卡氏菌获得的苯腈水合酶只能作用于芳香腈而不能催化脂肪腈水解。酶分子量约为 560kDa, 含 12 个亚基。

当前, 对芳香腈和杂环芳腈水合酶的研究报道甚少。Nagasawa^[30] 从红球菌 J₁ 中获得了含有金属 Co 的 3-氰基吡啶水合酶, 酶的电泳特性表明, 该酶包含有相对分子量分别为 26kDa 和 29kDa 的两种亚基, 其分子量为 505kDa。

(四) 应用前景

应用生物工程技术转化丙烯腈生产丙烯酰胺和传统的含铜催化剂催化水合工艺相比较, 具有反应条件温和、流程简单、产率高和产品纯化方便等优点^[1,30]。日东化学工业公司与 Kyoto 大学农化系共同研究开发了应用阳离子型聚丙烯酰胺凝胶固定红球菌 N-774 细胞生产丙烯酰胺的新工艺, 达到了年产 6000 吨丙烯酰胺的工业化规模^[1]。

虽然应用微生物转化法, 由 3-氰基吡啶生产尼克酰胺和尼克酸目前仍处于实验室研究阶段, 但已显示了经典化学合成法所不可比拟的优越性。Nagasawa^[9] 等应用筛选到的红球菌 J₁ 静止细胞反应, 将 3-氰基吡啶专一性地转转化生成尼克酰胺。在最适培养和转化反应条件下, 可 100% 转化 3-氰基吡啶为尼克酰胺, 反应 9 小时, 尼克酰胺积累浓度可达 1465g/L。Mathew 等^[8] 应用在特定条件下培养的红球菌 J₁ 静止细胞, 实现了 100% 转化 3-氰基吡啶为尼克酸, 在最适反应条件下, 26 小时反应后溶液中尼克酸含量可达 172g/L, 且无尼克酰胺检出。另外, 利用该菌的酶促水合工艺还可生产异尼克酰胺 (1099g/L), 吡啶酰胺 (977g/L), 抗结核药吡嗪酰胺 (985g/L), 农用药物 2,6-二氟苯酰胺 (306g/L), 噻吩羧基酰胺 (210g/L), 3-吡啶基乙酰胺 (1045g/L), 苯甲酰胺 (489g/L) 和 2-咪唑羧基酰胺 (522g/L)^[31]。

综上所述可以预见, 腈化物的微生物代谢、转化反应具有专一性强、反应条件温和、反应迅速、产物纯度高、后处理方便、能耗低、成本低

廉等诸多优点,这一领域的研究工作将进入一个更广泛更深入的发展阶段,在应用开发领域也将获得新的进展。

参 考 文 献

1. Nagasawa T et al.: *Eur. J. Biochem.*, **162**: 691—698, 1987.
2. Asano Y et al.: *Agri. Biol. Chem.*, **46**: 1183, 1982.
3. Fukuda Y et al.: *J. Ferment. Technol.*, **49**: 1011—1016, 1971.
4. Fukuda Y et al.: *J. Ferment. Technol.*, **51**: 393—397, 1973.
5. Maestracci M et al.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **36**: 69—115, 1988.
6. 李文忠等: 微生物学报, **30**(1): 29, 1990.
7. Wenzhong Li et al.: *J. Environ. Sci.*, **3**(3): 91—97, 1991.
8. Mathew C D: *Appl. Environ. Microbiol.*, 1030—1032, 1988.
9. Nagasawa T et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 1766—1769, 1988.
10. Mauger J et al.: *J. Biotech.*, **8**: 87—95, 1988.
11. 李文忠等: 微生物学通报, **16**(6): 348—352, 1989.
12. Nagasawa T et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**: 88—97, 1988.
13. Nagasawa T et al.: *Arch. Microbiol.*, **150**: 89—94, 1988.
14. Clarke P H et al.: *J. General Microbiology.*, **75**: 231, 1973.
15. Jallageas J G et al.: *Adv. Biochem. Eng.*, **14**: 22—25, 1980.
16. Jallageas J G et al.: *Adv. Biochem. Eng.*, **14**: 7—9, 1980.
17. Thimann K et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**: 133—144, 1964.
18. Harper D B: *Biochem. J.*, **165**: 309, 1977.
19. Harper D B: *Biochem. J.*, **167**: 685, 1979.
20. Yamada H et al.: *J. Ferment. Technol.*, **58**: 496—500, 1980.
21. Bandyopadhyay A K et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 302—306, 1986.
22. Asano Y et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**(9): 2251—2252, 1980.
23. Asano Y et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(5): 1183—1189, 1982.
24. Vematsu T et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**: 614, 1974.
25. Theriault R J et al.: *Biochemistry*, **11**: 385, 1972.
26. Asano Y et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(5): 1165—1174, 1982.
27. Thiery A et al.: *J. Basic. Microbiol.*, **26**: 299—311, 1986.
28. Asano Y et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(5): 1175—1181, 1982.
29. Goldlast et al.: *Biotech. Appl. Biochem.*, **11**(6): 581—601, 1989.
30. Nagasawa T et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**: 1305—1312, 1986.
31. Mauger J et al.: *Tetrahedron.*, **45**: 1347—1354, 1989.

(1992-4-20 收稿)