

有机腈生物转化生产医药中间体

金利群, 王亚军, 郑仁朝, 郑裕国*, 沈寅初(浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310032)

中图分类号: R915.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2005)09-0853-03

生物技术是应用自然科学及工程学的原理, 依靠生物催化剂的作用将物料进行加工以提取产品或为社会服务的技术, 其实质是利用生物催化剂从事生物技术产品的生产过程。生物技术在医药方面的应用是最为关注的领域之一, 特别是现代生物技术的应用常集中于医药方面。为了争夺生物制药工业的市场, 各国正在大力发展以知名大学和研究机构为中心, 带动企业而形成的产业群。有专家预言, 生物技术将取代信息技术, 成为“对全社会最为重要并可能改变未来工业和经济格局的技术”。生物技术产业在未来的 15 年左右可能成为新的主导产业。美国的孟山都公司 1977 年由生物技术生产的销售额已占其销售总额的 70% 以上。杜邦公司在 1999 年也开始向生物技术进军, 开发的生物法合成乙醛酸转化率和选择性都达到了 100%^[1-3]。

“采用生物技术解决化学工程问题”——是贯穿许多生物化工领域科研工作的根本策略。近几年来, 以光学纯药物给药已引起各方面的重视。随着人们对异构体药效的进一步认识, 发现光学纯药物比混旋体药物有疗效好、安全性好的特点。世界范围内单一一对映体形式的手性药物以每年 15% 的速率增长, 到 2000 年已经达到了 900 亿, 21 世纪手性药物的产量具有明显增长^[4,5]。医药中间体的生产是人类发展的永恒课题, 微生物酶转化来生产医药中间体具有化学合成不可比拟的特点, 是当前工业生物技术发展的一大热点。

生物法生产丙烯酸酰胺技术的成功, 为腈化合物生物转化技术研究的开展提供了坚实的基础。几年来, 我们一直进行腈化合物的生物催化研究, 对腈水解酶和腈水合酶的提取分离纯化、生物催化过程工程、微生物细胞的选育等方面进行了较多的工作, 以腈化合物为底物, 生物催化和生物转化生产医药中间体前景广阔。

1 有机腈化合物

腈化合物(RCN)广泛存在于自然界中, 以氰脂、氰糖苷、脂肪族腈和芳香族腈等形式分布在许多高等植物和土壤微生物代谢体系中, 有的作为氮源的储存形式, 有的作为生长调节因子, 还有的作为保护剂防御外来侵害^[6,7]; 此外, 在塑料、纤维、杀虫剂、水处理剂和其它精细化学品的生产过程中都产生大量的有机腈化合物。在有机合成中, 氰基作为“水稳定负碳离子”引入有机物, 是一种重要的 C₁ 源, 能转化为胺、亚胺、酰胺、脒、羧酸和羰基化合物等^[8]。腈的水解反应

被广泛应用于氨基酸、酰胺、羧酸及其衍生物的合成, 在有机合成中占有极其重要的地位。腈的化学水解因其需要强酸(或强碱)、传统的化学法水解腈类物质能耗大、副产物多, 而且需在强酸或强碱的条件下进行, 因此只局限于那些不含易水解基团的腈类化合物, 而且不具选择性。相反, 通过微生物把腈类化合物转化为相应的酰胺和酸具有高效性、高选择性、反应条件温和、环境污染小、成本低、产物光学纯度高优点, 符合原子经济型和绿色化学的发展方向, 有着化学方法无可比拟的优越性。微生物酶催化腈水解反应的这些特性显示出其在有机合成上的巨大应用价值, 如催化氨基腈、脂肪腈、酮腈、二腈、芳香腈生成具有光学活性的氨基酸、羧酸、酮酸、单氨基羧酸等, 逐渐成为微生物转化的研究热点之一。

2 腈酶

降解有机腈化合物的微生物酶系主要有两类: 腈水解酶(Nitrilases, EC 3.5.5.1)和腈水合酶(Nitrile Hydratases, NHase, EC4.2.1.84)。腈水解酶直接将腈水解为相应的羧酸和氨, 腈水合酶将腈水解成相应的酰胺, 如果微生物细胞内还存在酰胺酶(Amidase, E. C. 3.5.1.4), 则在其作用下进一步将酰胺水解为羧酸和氨^[9,10](图 1)。

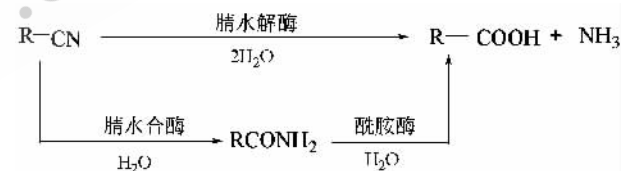


图 1 有机腈生物转化途径

Fig 1 Two processes of nitrile metabolism in biosystem

腈酶的对映选择性显示出它在生产光学活性药物、农药、铁电性晶体等方面的巨大潜力, 利用腈酶的这一特性以腈类化合物为底物生产手性化合物是当前医药行业的热点。2-芳基丙腈类衍生物, 选择性水解后的产物, 如 S-(+)-2-苯基丙酸, 是非甾体抗炎药和拟除虫菊酯重要的中间体。光学活性 α-羟基酸, 是许多化学合成抗生素的前体, 可以通过腈水解酶转化外消旋氰醇来合成。Rhodococcus rhodochrous PA-34 腈水解酶不对称水解 α-氨基腈得到光学纯 L-氨基酸(D-丙氨酸); Preiml 等研究以 β-氨基腈为底物合成 β-氨基酸; D-苯基甘氨酸是工业上酶法合成半合成 β-内酰胺类抗生

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(No. 2003CB716005)(973 项目)资助

* 通讯作者, 0571-88320614, E-mail: zhengyg@zjut.edu.cn

素(如头孢菌素、青霉素)的重要前体。Rhodococcus sp. MA-WA 以 D,L-苯基甘氨酸为底物,得到 D-苯基甘氨酸的 ee 值 99% (产率 48%), L-苯基甘氨酸的 ee 值 97% (产率 52%)^[11-14]。

3 生物转化腈类化合物生产医药中间体

3.1 S-(+)-2,2-二甲基环丙酰胺

S-(+)-2,2-二甲基环丙酰胺合成的重要性在于其在医药工业上的应用,2003 年的全球市场容量约 5 亿美元。亚胺培南(Imipenem)是一种最有前途的 β-内酰胺抗生素,但易被肾脱氢肽水解酶 I 钝化。西司他丁(Cilastatin)是一个很好的脱氢肽水解酶 I 的抑制剂,可以提高亚胺培南在体内的稳定性(Wang 等,1998)^[15]。临床实验表明,西司他丁与亚胺培南的复方制剂特别适用于治疗多种菌联合感染以及需氧菌和厌氧菌的混合感染(Carmellini 等,1998)^[16]。传统的化学制备 S-(+)-2,2-二甲基环丙酰胺方法需要 6 步反应,收率约 12.5% (w/w)^[17]。该方法的缺陷是:产物为外消旋体,副产物分离困难,反应条件苛刻,环境污染大。利用腈水合酶生物合成光学活性酰胺可以克服上述缺陷。

3.2 α-羟基乙酸

尽管羟基乙酸的生物学功能在 20 世纪 70 年代已被揭示,并作为食品添加剂通过了 FDA 认证,在清洁业、化妆品制造等领域以及作为药物控释材料、生物可吸收支架材料单体具有重要的应用,但生物合成羟基乙酸尚未实现产业化^[13,14]。工业上常用羟基乙酸制备包括化学合成法和提取法。化学合成法制备羟基酸主要有 2 种方法:羟基腈化合物在一定条件下水解腈基引入羧基;羧酸分子中引入羟基,α-卤代酸水解可制备 α-羟基酸,产率较高。但由于化学合成法反应条件苛刻,需要高温高压使羟基乙酸发生自聚现象,这降低了羟基乙酸收率和工艺的经济效益,同时,化学合成对环境造成污染。

近年来,生物催化与生物转化技术因环境友好、反应条件温和、环境污染小和选择性高而引起广泛关注,该绿色合成技术具有显著的经济效益和社会效益。利用羟基乙腈水解酶催化羟基乙腈合成羟基乙酸反应体系底物单纯,副产物少。利用生物催化剂合成羟基乙酸是今后羟基乙酸工业的发展趋势。

3.3 β-氨基丙酸

维生素 B₃(泛酸)由泛解酸和 β-氨基丙酸组成,存在于一切组织之中,它是辅酶 A 的成分,是体内能量代谢中不可缺少的成分。泛酸参与碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢,特别是对脂肪的合成与代谢起十分重要的作用。泛酸还是形成乙酰胆碱所必需的物质。缺乏泛酸可使动物生长速度下降,皮肤受损,神经系统紊乱,抗体形成受阻。

β-氨基丙酸是制备泛酸钙的重要中间体,生产 β-氨基丙酸的方法有多种,目前研究较多的是化学法生产,利用在较高的压力和温度下丙烯酸(或其酯或盐)与氨水进行反应,由于此法存在着一系列化学法生产的缺点,因此利用生物技术法来代替化学法是一种趋势^[12]。

目前研究的利用生物法生产 β-丙氨酸主要有两种途径(图 2):



图 2 β-氨基丙酸生物合成

Fig 2 Biosynthesis of β-aminopropionic acid

虽然微生物法生产 β-丙氨酸还没实现工业化生产,但它具有酶催化的一系列优点,所以是当前人们研究的方向。我们已经筛选得到具有较高酶活力的微生物菌株,对 β-氨基丙酸的生物转化和生物催化工艺过程进行了研究,已取得了具有产业化前景的研究成果。

3.4 烟酰胺

烟酸又称尼克酸(Nicotinic acid)、烟酰胺又称尼克酰胺(Nicotinamide)。烟酸、烟酰胺存在细胞中,通常作为许多辅酶的辅基,以结合形式存在。烟酸、烟酰胺作为医药可治疗糙皮病,还可以添加到食品中以补充人体所需要的维生素,它最大的应用领域是作为饲料添加剂。美国在饲用维生素中氯化胆碱的用量最大,占总用量的 74%,而烟酸、烟酰胺为第二位,约占 18%。

一直以来对于 Vpp 的生产都用传统的化学合成工艺,产率低,纯度差,反应条件苛刻。烟酰胺最初的合成方法是从实验室中通过氢氧化尼克丁得到的,工业上是从 3-甲基吡啶、2-甲基-5-乙基吡啶、喹啉等为原料的合成工艺,有高锰酸钾氧化法、硝酸氧化法、氨氧化法、气相氧化法、电解氧化法以及其它氧化法等,得到烟腈、烟腈用碱水解,选择适当的条件,控制水解程度,可分别得到烟酸或烟酰胺。

而应用腈水合(解)酶产生菌转化 3-氰基吡啶生产尼克酰胺和尼克酸日益受到研究者的关注^[11]。上海农药研究所的沈寅初院士、薛建萍高工等开发了烟腈微生物催化生产烟酰胺技术。利用生物技术法生产 Vpp 具有反应条件温和、流程简单、产物产率和纯度高等诸方面都显示出化学合成法所不可比拟的优点。

4 展望

生物催化合成已成为化学品合成的支柱。利用生物催化(酶、细胞等催化)合成化学品不但具有条件温和、转化率高的优点,而且可以合成手性化合物及高分子,手性化合物是国外目前生物技术的主要生产产品。因此微生物腈水解酶类在医药中间体的合成中具有广泛的应用前景,生物催化腈类化合物生产医药中间体是当前微生物工业研究的一大热点。

参考文献

[1]

李宁,安道昌,李青,等.我国生物技术产业发展的前景分析.高技术通讯,2000,09:100-104.

[2]

丁锡申.生物技术药物产业化发展的新趋势.中国生物工程杂志,2004,11:77-78.

[3]

Isao Endo, Masafumi Odaka, Masafumi Yohda. Trends in Bio-

- technology, 1999, 17: 244-248.
- [4] 张玉彬. 生物催化的手性合成. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [5] Baldwin S. P., Saltzman W. M. Materials for protein delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 33: 71-86.
- [6] Faber K. *Biotransformation in organic synthesis* (3rd ed.). Springer-Verlag: 1997.
- [7] Kobayashi M, Shimizu S. Nitrile hydrolases *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000, 4: 95-102.
- [8] OGrady D., Pembroke J. Isolation of a novel *Agrobacterium* spp. capable of degrading a range of nitrile compounds. *Biotech. Lett.*, 1994, 16: 47-50.
- [9] P. K. Mascharak, Structural and functional models of nitrile hydratase, *Coordination Chemistry Reviews*, 225: 201-214, 2002.
- [10] Banerjee A., Sharma R., Banerjee U. C., The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 60: 33-44.
- [11] T. Nagasawa, C. D. Mathew, J. Kobayashi, and H. Yamada. Nitrile hydratase-catalyzed production of nicotinamide from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus* J1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54: 1766-1769.
- [12] Preiml M., Hillmayer K., Klempier N., A new approach to β -amino acids: biotransformation of N-protected β -amino nitriles. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44: 5057-5059.
- [13] Ahna K. S, Parka K. S, Junga K. M, Junga H. K, *et al.* Inhibitory effect of glycolic acid on ultraviolet B-induced c-fos expression, AP-1 activation and p53-p21 response in a human keratinocyte cell line. *Cancer Letters*, 2002, 186: 125-135.
- [14] Ambrosio A. M. A., Allcock H. R., Katti D. S., Laurencin C. T. Degradable polyphosphazene / poly (α -hydroxyester) blends: degradation studies. *Biomaterials*, 2002, 23: 1667-1672.
- [15] Wang QW, Yang FK, Du H, M. Hossain M, Bennett D, Grubisha DS. The synthesis of S-(+)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid: a precursor for cilastatin. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 9: 3971-3977.
- [16] Carmellini M, Matteucci E, Boggi U, Cecconi S, Giampietro O, Mosca F. Imipenem/cilastatin reduces cyclosporin-induced tubular damage in kidney transplant recipients. *Transplantation Proceedings*, 1998, 30: 2034-2035.
- [17] Qinwei Wang, Fukang Yang, Hong Du, *et al.* The synthesis of 2,2-dimethylcyclopropane-carboxylic acids: a precursor for cilastatin, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1998, 9: 3971-3977.