

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.04.003

赤红球菌 CGMCC3090 生物转化肉桂腈 合成肉桂酰胺的工艺

翟莹, 申雁冰, 汤睿, 郑宇, 王敏

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 针对目前肉桂酰胺工业生产采用的肉桂酸和二氯亚砷、浓氨水两步化学反应工艺存在安全性较低、产物分离纯化困难等问题, 建立并优化了赤红球菌 CGMCC3090 催化肉桂腈生成肉桂酰胺的转化工艺。研究表明: 底物肉桂腈浓度为 1.5 mol/L, 赤红球菌菌体质量浓度为 2.6 g/L, 在 30 °C、pH 7.5 条件下, 转化 5 h 后转化率可达 100%, 具有产物纯度高、无副产物肉桂酸生成的优势, 为赤红球菌 CGMCC3090 生物转化合成肉桂酰胺的工艺放大和生产性应用奠定了良好基础。

关键词: 赤红球菌; 生物转化; 肉桂酰胺; 腈水合酶

中图分类号: TQ920.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2014)04-0011-05

Biotransformation of Cinnamitrile into Cinnamamide with *Rhodococcus ruber* CGMCC3090

ZHAI Ying, SHEN Yanbing, TANG Rui, ZHENG Yu, WANG Min

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: At present, the method of cinnamamide production consists of two steps by using cinnamic acid, thionyl chloride and strong ammonia water. This chemical process has less security, product separation and purification are difficult and there are some other problems. To solve these problems, the process of biotransformation of cinnamitrile into cinnamamide using *Rhodococcus ruber* CGMCC3090 was established. It was found that the conversion after 5 h can reach 100% when the cinnamitrile was 1.5 mol/L, the cell concentration was 2.6 g/L, the temperature 30 °C and pH 7.5. This process has the advantage of high product purity without formation of cinnamic acid. It has laid a good foundation for the scale-up process and practical production of cinnamamide biosynthesis with *R. ruber* CGMCC3090.

Key words: *Rhodococcus*; biotransformation; cinnamamide; nitrile hydratase

腈水合酶是许多微生物催化腈化合物代谢的关键酶, 具有化学、区域、立体选择性, 宽泛的底物特异性, 能够降解有毒腈类物质或者代替化学方法生产酰胺药物, 并且已成功引入到化学工业中生产丙烯酰胺、烟酰胺和 5-氰基戊酰胺等^[1-10]。肉桂酰胺是一种重要的有机合成中间体, 广泛应用于医药合成及精细化工等领域, 可作为害虫的趋避剂, 且对线虫也有一定的抑制作用, 可抑制肿瘤的生长和转移, 是一种具

有开发前景的抗肿瘤化合物。肉桂酰胺的衍生物可作为脑神经保护剂、受体拮抗剂等^[11]。目前, 工业上生产肉桂酰胺主要通过肉桂酸和二氯亚砷加热生成肉桂酰氯, 再通过浓氨水和肉桂酰氯反应的二步反应合成。该化学工艺存在安全性较低、对设备要求高、产物分离纯化困难、环境污染严重等问题^[12]。

用微生物法代替化学法生产肉桂酰胺具有重要意义, 许多研究者致力于生物法生产肉桂酰胺的研

收稿日期: 2014-01-09; 修回日期: 2014-02-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21276196)

作者简介: 翟莹(1986—), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生; 通信作者: 王敏, 教授, minw@tust.edu.cn.

究. 1970年, Bezanson等^[13]利用 *Streptomyces vorticillatus* ATCC13495 所产苯丙氨酸脱氨酶生产肉桂酰胺, 并采用 ¹⁴C 标记 L-苯丙氨酸上的羧基碳进行其代谢途径的研究, 发现在链霉菌 ATCC13495 菌株的代谢途径中, L-苯丙氨酸部分生成肉桂酸, 然后得到肉桂酰胺; L-苯丙氨酸为 0.5 g/L 时, 脱氨酶活性为 210 mU/g(DCW). 1986年, Prevatt等^[14]报道了9株红球菌可以将肉桂腈转化为肉桂酰胺, 但是有副产物肉桂酸的生成, 增加了产物后续分离纯化的困难. 2004年, Brunati等^[15]研究发现22株不同的放线菌可以将肉桂酸转化为肉桂酰胺, 其中 *Streptomyces halstedii* 对肉桂酸的转化能力最强, 底物质量浓度为 2 g/L, 转化率达 95%, 其余菌株对 0.3 g/L 肉桂酸的转化率为 20%~80%, 产物得率较低, 制约了生物途径制备肉桂酰胺的产业化进程. 因此, 迫切需要找到一种反应条件温和, 生产条件及分离纯化过程简单的微生物方法代替化学生产方法.

本研究利用赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) CGMCC3090 对肉桂腈进行生物转化生成肉桂酰胺. 该菌株对肉桂腈具有较高的转化能力, 产物纯度高, 后续产品分离纯化简单.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

赤红球菌 (*Rhodococcus ruber*) CGMCC3090, 本研究室自土壤中筛选获得, 现保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心.

1.1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 琼脂 20, pH 7.2.

种子培养基(g/L): 甘油 10, 蛋白胨 5, 麦芽浸粉 3, 酵母粉 3, pH 7.0.

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 15, 酵母粉 5, 尿素 7, KH₂PO₄ 0.5, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, 谷氨酸钠 1, CoCl₂·6H₂O 2.38 × 10⁻², pH 7.0.

1.1.3 主要试剂和仪器

肉桂腈、肉桂酰胺、肉桂酸, 天津希恩思生化科技有限公司; 蛋白胨、酵母粉, 美国 BD 公司; 1260 型高效液相色谱仪 (HPLC), Agilent Technologies 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 赤红球菌 CGMCC3090 菌体培养

斜面培养: 30 °C 恒温培养 4~5 d.

种子培养: 挑取经斜面活化的赤红球菌 CGMCC3090 菌种 1 环, 接种于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 180 r/min、30 °C 培养 28 h.

发酵培养: 按 3% 的接种量将种子培养液接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 180 r/min、28 °C 培养 48 h.

1.2.2 赤红球菌静息细胞制备与肉桂腈转化反应

5 000 r/min 离心收集发酵培养的菌体, 用 KH₂PO₄-NaOH 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.0) 洗涤 3 次, 制备赤红球菌静息细胞, 将其悬浮于一定体积的缓冲液中, 使 A₆₀₀ = 0.7 ± 0.02 (稀释 50 倍). 将终浓度为 0.5 mol/L 的底物肉桂腈和 9 mL KH₂PO₄-NaOH 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.0) 加入 100 mL 的三角瓶中, 30 W 超声 5 min 使底物分散均匀, 30 °C 摇床保温 20 min, 加入终质量浓度为 0.7 g/L 的赤红球菌菌悬液, 30 °C 转化 (转化实验设定 3 个平行样, 下同). 按转化时间取适量转化液加入 2 倍体积乙酸乙酯萃取, 取适量乙酸乙酯萃取液, 挥发干后用甲醇重新溶解, 经 0.22 μm 微孔膜过滤后用于 TLC、HPLC 分析.

1.3 分析方法

1.3.1 转化样品 TLC 检测

将乙酸乙酯萃取液点样于薄层层析硅胶板, 以肉桂腈、肉桂酰胺标准品作对照, 展开体系为 V(氯仿): V(甲醇) = 9:1, 在紫外灯 (254 nm) 下观察赤红球菌 CGMCC3090 能否转化肉桂腈, 初步判断其转化情况.

1.3.2 转化率测定

采用高效液相色谱 (HPLC) 检测转化率. 色谱柱为 Phenomenex Luna C18 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm), 流动相 V(甲醇): V(水) = 8:2, 流量 0.6 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm. 按式 (1) 计算摩尔转化率.

$$y = \frac{c_0 - c}{c_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: c₀ 为转化起始底物浓度, mol/L; c 为转化终止时底物浓度, mol/L.

1.4 肉桂腈转化工艺的建立

1.4.1 转化温度的选择

肉桂腈浓度为 0.5 mol/L, 赤红球菌菌体质量浓度为 0.7 g/L, 以 50 mmol/L 的 KH₂PO₄-NaOH 缓冲液 (pH 7.0) 为反应介质, 分别考察 20、25、30、35、40 °C 下反应 4 h 的转化率.

1.4.2 转化 pH 的选择

反应温度为 30 °C, 反应时间 4 h, 分别考察 pH 在 5~9 区间变化时对反应的影响.

1.4.3 底物浓度对转化反应的影响

赤红球菌菌体质量浓度为 2.6 g/L, 反应温度为 30 °C, pH 为 7.5, 考察肉桂腈浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mol/L 对反应的影响.

1.4.4 菌体质量浓度对转化反应的影响

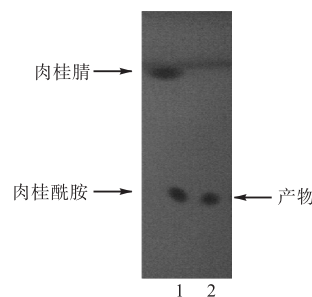
底物肉桂腈浓度为 1.5 mol/L, 反应温度为 30 °C, pH 为 7.5, 分别加入 1.3、2.0、2.3、2.6、3.0、3.3、4.0 g/L 的菌体, 测定其对反应的影响.

2 结果与分析

2.1 肉桂腈转化产物分析

转化液样品 TLC 检测结果见图 1, 底物肉桂腈 R_{fs} 和产物肉桂酰胺 R_{fp} 分别为 0.8 和 0.3, 说明底物和

转化产物的分离效果较好. 转化液在薄层板上出现目标产物肉桂酰胺斑点, 表明赤红球菌 CGMCC3090 可以转化肉桂腈生成目标产物, 而且转化率较高(未见残留的底物斑点).

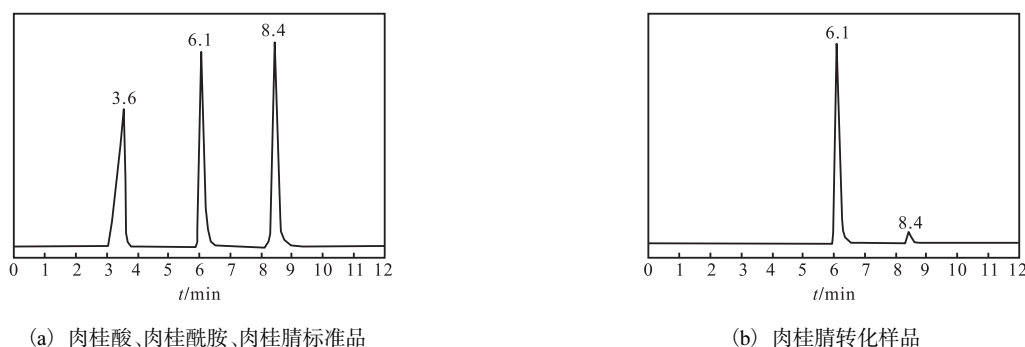


1. 肉桂腈和肉桂酰胺的混合标样; 2. 肉桂腈转化液

图 1 肉桂腈转化液的 TLC 谱图

Fig. 1 TLC spectrum of cinnamitrile biotransformation

进一步采用 HPLC 分析方法分析其转化情况, 图 2 是转化 4 h 时的转化反应液的 HPLC 谱图.



(a) 肉桂酸、肉桂酰胺、肉桂腈标准品

(b) 肉桂腈转化样品

图 2 肉桂腈转化液的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC spectrum of cinnamitrile transformation

由图 2 可以看出, 转化产物为肉桂酰胺(保留时间 6.1 min), 底物肉桂腈(保留时间 8.4 min) 基本被转化完全, 转化率 94.9%, 没有副产物肉桂酸(保留时间 3.6 min) 的生成.

2.2 肉桂腈转化工艺的确定

2.2.1 转化温度的选择

温度影响菌体细胞所产腈水合酶的活性、稳定性及选择性, 进而影响转化反应的速率. 已发现的腈水合酶的适宜温度在 10~45 °C. 温度对赤红球菌 CGMCC3090 转化肉桂腈的影响如图 3 所示. 由图 3 可知: 温度为 30 °C 时肉桂酰胺转化率达到最大值, 为 94.9%; 温度为 20 °C 和 40 °C 时, 转化率仍保持在 80% 以上, 说明赤红球菌 CGMCC3090 所产腈水合酶的适宜温度范围较宽. 这与来源于 *Rhodococcus rhodochrous* IFO15564^[16] 的腈水合酶(最适反应温度

为 30~40 °C) 特性一致.

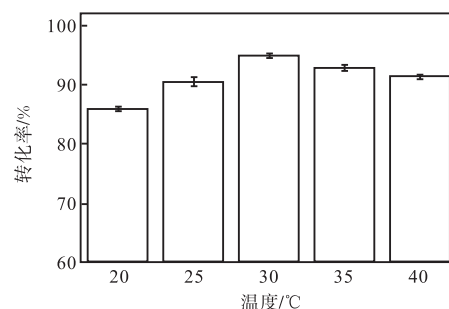


图 3 温度对转化反应的影响

Fig. 3 Effect of temperature on transformation

2.2.2 转化 pH 的选择

pH 影响微生物细胞酶分子的构象, 从而影响转化反应的速率. Kashiwagi 等^[16] 报道 *Rhodococcus*

rhodochrous IFO15564 所产腈水合酶的最适 pH 在 7.0 ~ 8.5 范围内. 从图 4 所示的 pH 对赤红球菌 CGMCC3090 转化肉桂腈的影响发现: 其 pH 为 7.5 时肉桂酰胺的转化率达到最大值, 为 97.2%; 在酸性条件下, 腈水合酶转化能力较低, 而偏弱碱性时, 即 pH 7 ~ 8 时其转化效率较高.

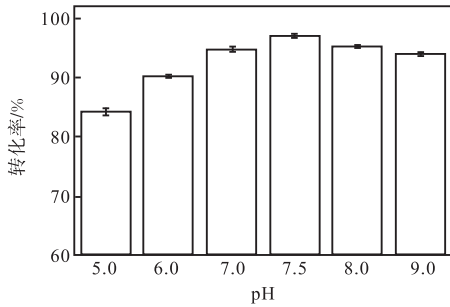


图 4 pH对转化反应的影响
Fig. 4 Effect of pH on transformation

2.2.3 底物浓度对转化反应的影响

Prevatt 等^[14]利用 *Rhodococcus* 所产腈水合酶将肉桂腈水解生成肉桂酰胺, 底物浓度为 5 mmol/L, 转化 23 h 后, 肉桂酰胺的产率仅为 40%, 副产物肉桂酸的产率为 57%, 带来目标产物的分离纯化困难. 赤红球菌 CGMCC3090 能够较好地催化肉桂腈, 肉桂腈底物浓度对转化过程的影响如图 5 所示. 由图 5 可以看出: 底物浓度为 3.5 mol/L 时转化速率较慢; 当初始肉桂腈浓度较低时 (≤ 1.5 mol/L), 转化非常迅速, 转化 5 h, 底物转化率达 100%. 可见, 赤红球菌 CGMCC3090 静息细胞对底物肉桂腈的耐受性较高, 易于实现高浓度的产物合成.

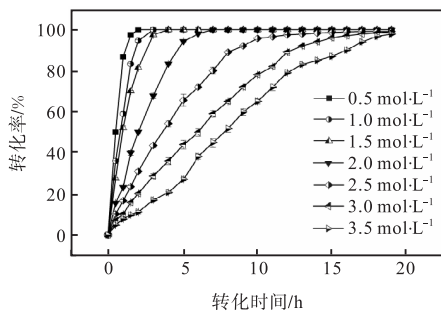


图 5 底物浓度对转化反应的影响
Fig. 5 Effect of initial substrate concentration on transformation

2.2.4 菌体质量浓度对转化反应的影响

初始肉桂腈底物浓度为 1.5 mol/L, 不同菌体质量浓度对肉桂酰胺转化生产的影响见表 1, 转化速率随着菌体质量浓度的增加而提高. 当菌体质量浓度

为 2.6 g/L 时, 反应 5 h 时, 肉桂酰胺转化率为 100%, 无副产物肉桂酸产生.

表 1 菌体质量浓度对转化反应的影响

Tab. 1 Effect of cell concentrations on transformation

菌体质量浓度/ (g·L ⁻¹)	转化率/%		
	0.5 h	2 h	5 h
1.3	5.1 ± 0.3	37.6 ± 0.6	70.1 ± 0.5
2.0	12.2 ± 0.8	54.3 ± 1.2	87.8 ± 0.7
2.3	19.5 ± 0.6	76.3 ± 0.8	97.4 ± 0.3
2.6	24.9 ± 0.5	82.3 ± 0.6	100
3.0	32.7 ± 0.8	86.5 ± 0.3	100
3.3	40.9 ± 0.6	90.2 ± 0.4	100
4.0	53.3 ± 0.8	94.5 ± 0.2	100

图 6 为赤红球菌 CGMCC3090 静息细胞生物转化肉桂腈生成肉桂酰胺的过程曲线. 反应 5 h 时, 1.5 mol/L 肉桂腈转化率达到 100%, 进一步延长至 8 h, 转化产物保持稳定, 未发生进一步的转化衍生反应, 也未发现有腈水合酶转化反应常伴随出现的羧酸的生成. 产物肉桂酰胺为白色固体, 微溶于水, 随着反应的不断进行, 高浓度的转化产物以固态形式从反应液中析出, 底物肉桂腈为浅黄色液体, 不溶于水, 表现出多相反应特征.

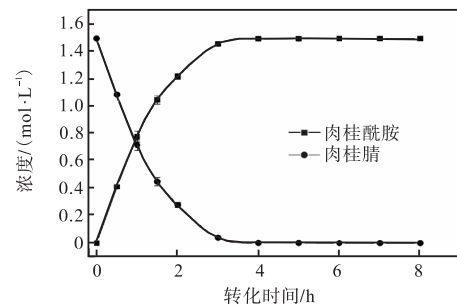


图 6 赤红球菌 CGMCC3090 转化肉桂腈反应过程曲线
Fig. 6 Course of cinnamitrile transformation by *R. ruber* CGMCC3090

3 结 论

赤红球菌 CGMCC3090 可以转化肉桂腈生成肉桂酰胺. 肉桂酰胺的最适转化生产条件: 转化温度 30 °C、初始转化 pH 7.5、赤红球菌菌体质量浓度为 2.6 g/L、底物肉桂腈浓度为 1.5 mol/L, 转化 5 h 后转化率达 100%且无副产物生成.

参考文献:

[1] Prasad S, Bhalla T C. Nitrile hydratases (NHases) : at the

- interface of academia and industry[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 725–741.
- [2] Wang M X. Enantioselective biotransformations of nitriles in organic synthesis[J]. *Topics in Catalysis*, 2005, 35(1/2): 117–130.
- [3] Velankar H, Clarke K G, du Preez R, et al. Developments in nitrile and amide biotransformation processes[J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(11): 561–569.
- [4] Mauger J, Nagasawa T, Yamada H. Synthesis of various aromatic amide derivatives using nitrile hydratase of *Rhodococcus rhodochrous* J1[J]. *Tetrahedron*, 1989, 45(5): 1347–1354.
- [5] Black G W, Gregson T, Mcpake C B, et al. Bio-transformation of nitriles using the solvent-tolerant nitrile hydratase from *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 [J]. *Tetrahedron Letters*, 2010, 51(13): 1639–1641.
- [6] Kinfe H H, Chhiba V, Frederick J, et al. Enantioselective hydrolysis of β -hydroxy nitriles using the whole cell biocatalyst *Rhodococcus rhodochrous* ATCC BAA-870 [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 59(4): 231–236.
- [7] Feng Y S, Chen P C, Wen F S, et al. Nitrile hydratase from *Mesorhizobium* sp. F28 and its potential for nitrile biotransformation[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(12): 1391–1397.
- [8] Watanabe I, Satoh Y, Enomoto K. Screening, isolation and taxonomical properties of microorganisms having acrylonitrile-hydrating activity[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, 51(12): 3193–3199.
- [9] Nagasawa T, Mathew C D, Mauger J, et al. Nitrile hydratase-catalyzed production of nicotinamide from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(7): 1766–1769.
- [10] Hann E C, Eisenberg A, Fager S K, et al. 5-Cyanovaleramide production using immobilized *Pseudomonas chlororaphis* B23[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1999, 7(10): 2239–2245.
- [11] 徐长亮,王菊仙,白晓光,等. 肉桂酰胺类化合物抗癌活性研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2013, 8(1): 46–52.
- [12] 徐晓勇,钱旭红,滕青衫,等. 生物途径制备肉桂酰胺的方法:中国,201110041278. X[P]. 2011–02–18.
- [13] Bezanson G S, Desaty D, Emes A V, et al. Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonialyase in *Streptomyces verticillatus* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1970, 16(3): 147–151.
- [14] Prevatt W D, Akin C, Evans A J. Selective conversion of cyano compounds to amides and carboxylic acids:US, 4629700[P]. 1986–12–16.
- [15] Brunati M, Marinelli F, Bertolini C, et al. Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with *Actinomyces* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(1): 3–9.
- [16] Kashiwagi M, Fuhshuku K I, Sugai T. Control of the nitrile-hydrolyzing enzyme activity in *Rhodococcus rhodochrous* IFO 15564: Preferential action of nitrile hydratase and amidase depending on the reaction condition factors and its application to the one-pot preparation of amides from aldehydes[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 29(1): 249–258.

责任编辑:常涛