

## 腈转化酶在精细化学品生产中的应用

郑裕国, 薛亚平, 柳志强, 郑仁朝, 沈寅初

浙江工业大学生物工程研究所, 杭州 310014

**摘要:** 腈化合物是一类重要的用于合成多种精细化学品的化合物, 它们容易制备, 并且可以合成多种化合物。传统化学水解方法将腈化合物转化为相应的羧酸或酰胺通常需要高温、强酸、强碱等相对苛刻的条件, 腈转化酶(腈水解酶、腈水合酶和酰胺酶)由于其生物催化过程具有高效、高选择性、条件温和等特点, 在精细化学品的合成中越来越受到人们的关注。许多腈转化酶已经被开发出来并用于精细化学品的生产。以下介绍了腈转化酶在医药及中间体、农药及中间体、食品与饲料添加剂等精细化学品生产中的应用。随着研究的不断深入, 将会有更多的腈转化酶被开发出来并用于精细化学品的生产。

**关键词:** 腈水合酶, 腈水解酶, 酰胺酶, 腈转化酶, 生物催化, 精细化学品

## Applications of nitrile converting enzymes in the production of fine chemicals

Yuguo Zheng, Yaping Xue, Zhiqiang Liu, Renchao Zheng, and Yinchu Shen

Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

**Abstract:** Nitriles are an important type of synthetic intermediates in the production of fine chemicals because of their easy preparations and versatile transformations. The traditional chemical conversion of nitriles to carboxylic acids and amides is feasible but it requires relatively harsh conditions of heat, acid or alkali. Nitrile converting enzymes (nitrilase, nitrile hydratase and amidase) which are used as biocatalyst for the production of fine chemicals have attracted substantial interest because of their ability to convert readily available nitriles into the corresponding higher value amides or acids under mild conditions with excellent chemo-, regio- and stereo-selectivities. Many nitrile converting enzymes have been explored and widely used for the production of fine chemicals. In this paper, various examples of biocatalytic synthesis of pharmaceuticals and their intermediates, agrochemicals and their intermediates, food and feed additives, and other fine chemicals are presented. In the near future, an increasing number of novel nitrile converting enzymes will be screened and their potential in the production of useful fine chemicals will be further exploited.

**Keywords:** nitrilase, nitrile hydratase, amidase, nitrile converting enzymes, biocatalysis, fine chemicals

腈是一类重要的用于合成多种化学品的化合物, 它的水解反应可以被广泛应用于氨基酸、酰胺、羧酸及其衍生物等精细化学品的合成, 在精细化学品合成中占有极其重要的地位。然而, 氰基的传统化

**Received:** September 27, 2009; **Accepted:** November 4, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2009AA02Z203), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724704), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Z4090612).

**Corresponding author:** Yuguo Zheng. Tel: +86-571-88320360; Fax: +86-571-88320360; E-mail: Zhengyg@zjut.edu.cn

国家高科技研究发展计划(863 计划)(No. 2009AA02Z203), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2009CB724704), 浙江省自然科学基金(No. Z4090612)资助。

学水解方法通常需要强酸、强碱条件, 并须高温回流, 而且常伴随有大量盐类形成, 给分离纯化带来困难, 也造成一定的环境污染。腈的酶法水解具有高效性、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, 符合原子经济和绿色化学发展的方向, 有着化学方法无可比拟的优越性<sup>[1-6]</sup>。可见, 腈的酶法水解在有机合成方面具有巨大的应用潜力。自上世纪六、七十年代陆续发现腈转化酶以来, 腈转化酶已成为开发最为成功的生物催化剂之一, 用于大规模合成丙烯酰胺、烟酰胺等大宗及精细化学品。1985 年日本日东公司(Nitto Co.)成功开发了腈水合酶生物催化丙烯腈生产丙烯酰胺的工业化生产技术。国内, 沈寅初在上海市农药研究所领导的研究小组于上世纪 80 年代中期开始了腈水合酶生物催化生产丙烯酰胺的研究, 经过多年攻关, 也成功开发了这一新技术, 建立了我国第一套利用生物催化技术生产大宗化工原料的工业化装置, 并经过多年的发展和改良, 在腈水合酶催化法生产丙烯酰胺的工艺技术和生产规模上达到了国际领先水平。

随着对腈转化酶催化机理、酶学特性、催化中心结构等研究的日益深入, 腈转化酶生物催化的研究热点, 也由大宗化学品跨跃到具有重要功能的含有一个或多个手性中心的精细化学品的合成, 微生物腈转化酶生物催化氨基腈、烃基腈、酮腈、二腈和芳香腈生产氨基酸、羧酸、酮酸、单羧基羧酸等精细(手性)化学品的研究也已发展成为新的研究方向, 将为精细化工产品的工业化生产技术开辟一条新的途径。

## 1 催化腈水解的途径及酶类

目前研究表明, 腈主要通过两种途径水解, 一是经腈水合酶催化水合得到酰胺, 然后在酰胺酶的催化下生成酸和氨<sup>[6]</sup>, 二是在腈水解酶的催化下直接生成酸和氨<sup>[1,7]</sup>(图 1)。一般而言, 脂肪族的腈通过第一个途径得到水解, 芳香族和环腈是通过第二个途径进行水解, 腈水合酶和腈水解酶为腈的水合或水解提供了独特的方法。

腈水解酶、腈水合酶和酰胺酶是具有广泛的底

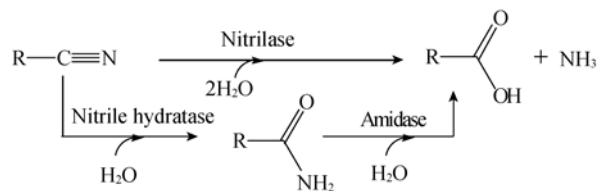


图 1 腈化合物在微生物体内的降解途径

Fig. 1 Pathways of nitrile compounds by nitrile converting enzymes in microorganisms.

物适应性的参与腈化合物代谢的生物催化剂, 由于天然腈化物的广泛存在, 使很多微生物都具有降解腈化物的能力, 为发现并利用这些酶创造了有利条件。其高效单一的反应、优良的选择性使之在有机合成中表现出巨大应用潜力。目前就文献报道的具有腈代谢功能的微生物菌株不少于 50 种(表 1), 主要是红球菌 *Rhodococcus*、假单胞菌 *Pseudomonas*、假诺卡氏菌 *Pseudonocardia*、节杆菌 *Arthrobacter*、芽孢杆菌 *Bacillus*、丛毛单胞菌 *Comamonas*、棒状杆菌 *Corynebacterium*、短杆菌 *Brevibacterium* 以及诺卡氏菌 *Nocardia* 等。本课题组建立和发展了多种关键酶的高通量筛选技术<sup>[8-10]</sup>, 经过多年的积累, 构建了组成合理、内涵丰富的腈转化酶微生物库。库内共保藏各种关键酶产生菌 100 余株, 向中国典型培养物保藏中心递交专利菌株二十多株。其中 *Rhodococcus equi* CCTCC M 205114<sup>[8]</sup>, *Brevibacterium epidermidis* CCTCC M207076<sup>[11]</sup>, *Bacillus subtilis* CCTCC M 206038<sup>[12]</sup> 等为首次报道的腈水解酶或酰胺酶产生菌, 丰富了精细化学品制造关键酶的新来源。

## 2 腈转化酶在精细化学品生产中的应用

近几年来, 腈化合物的生物催化技术发展迅速, 腈转化酶在精细化学品生产中的应用已取得了令人瞩目的成就, 无论在应用数量还是种类上都有较大发展, 在医药及其中间体、农药及其中间体、食品及饲料添加剂等领域得到了广泛应用。

### 2.1 在医药及中间体生产中的应用

(S)-(+)-2, 2-二甲基环丙烷甲酰胺是西司他丁钠的关键手性中间体, 占其原料成本的 1/3 以上, 目前工业上应用的化学合成工艺反应步骤多, 条件苛刻, 收率低(不超过 10%), 且过程使用大量有毒有害溶

表 1 常见的催化腈水解的酶类及其来源<sup>[5]</sup>

Table 1 Some previously reported microorganisms with nitrile converting enzymes activity

Enzyme	Microorganisms
Nitrile hydratase (E.C.4.2.1.84)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3, <i>Arthrobacter</i> sp. J-1, <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus</i> sp. BR 449, <i>Bacillus smithii</i> SC-J05-1, <i>Brevibacterium imperialis</i> CBS 489-74, <i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM 3095, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J-1, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> R312, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> LL 100-21, <i>Rhodococcus erythropolis</i> BL1, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> A4, <i>Rhodococcus</i> sp. AJ270, <i>Rhodococcus</i> sp. SHZ-1, <i>Nocardia</i> sp. 108, <i>Rhodococcus</i> sp. ZJUT-N595, <i>Rhodococcus</i> sp. N 774, <i>Candida guilliermondii</i> CCT 7207, <i>Candida famata</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> UFMG-Y61
Nitrilase (E.C.3.5.5.1)	<i>Acidovorax facilis</i> 72W, <i>Fusarium solani</i> IM1196840, <i>Bacillus pallidus</i> Dac52, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> JM3, <i>Cryptococcus</i> sp. UFMG-Y28, <i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC8750, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J-1, <i>Penicillium multicolor</i> , <i>Rhodococcus rhodochrous</i> NCIMB 11216, <i>Exophiala oligosperma</i> R1, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> PA-34, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> K22, <i>Comamonas testosterone</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM7155, <i>Rhodococcus rubber</i> , <i>Acinetobacter</i> sp. AK 226, <i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Arthrobacter</i> sp. J1, <i>Streptomyces</i> sp. MTCC 7546, <i>Bacillus subtilis</i> ZJB-063, <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> ZJUTB06-99
Amidase (E.C.3.5.1.4)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> MP50, <i>Geobacillus pallidus</i> RAPc8, <i>Sulfolobus tokodaii</i> strain 7, <i>Delftia acidovorans</i> , <i>Arthrobacter</i> sp. J-1, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8, <i>Rhodococcus</i> sp. AJ270, <i>Xanthobacter flavus</i> NR303, <i>Brevibacterium</i> sp. Strain R312, <i>Variovorax paradoxus</i> , <i>Pseudonocardia thermophila</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. MCI3434, <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Brevibacillus borstelensis</i> BCS-1, <i>Ochrobactrum anthropi</i> SV3, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain d3, <i>Sulfolobus solfataricus</i> MT4, <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTR1, <i>Bacillus stearothermophilus</i> BR388, <i>Delftia tsuruhatensis</i> ZJB-05174

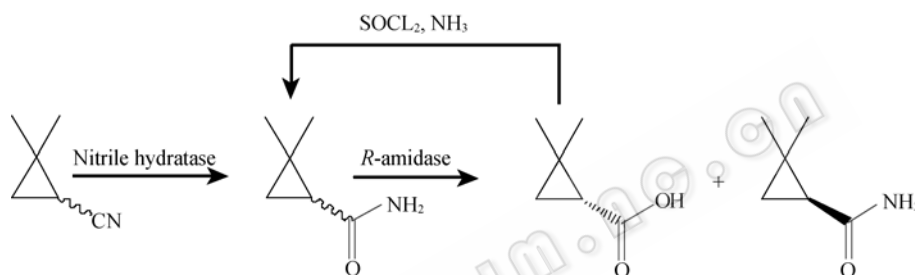


图 2 腈水合酶/R-酰胺酶制备西司他丁中间体(S)-(+)-2,2-二甲基环丙烷甲酰胺

Fig. 2 Preparation of cilastatin intermediate (S)-(+)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxamide by nitrile hydratase/R-enantioselective amidase.

剂, 环境污染严重, 原子经济性低。本课题组建立了高通量立体选择性酰胺酶筛选方法<sup>[9]</sup>, 发现了产 R-型酰胺酶微生物新菌株, 创建了腈水合酶/R-酰胺酶双酶耦联生物催化生产西司他丁钠关键中间体(S)-(+)-2,2-二甲基环丙烷甲酰胺的新工艺(图 2)<sup>[13]</sup>。该工艺的批次转化率达到 47%以上, 产物 e.e.%大于 99%; 考虑副产物回收后, 综合收率达到 72%以上。而且, 通过工艺创新, 从源头上革除了有毒有害溶剂的使用, “三废”排放量大大减少, 该技术工艺已在生产中大规模应用。

R-扁桃酸是一种有着广泛用途的化学中间体, 它可以合成血管扩张剂-环扁桃酯、尿路消毒剂-扁桃酸乌洛托品等药物。光学活性的扁桃酸具有很好的生物分解性, 是目前最受瞩目的酸性光学拆分剂, 成为热点的精细化工中间体。德国 BASF 公司利用腈水解酶, 用于 R-扁桃酸的生产<sup>[14]</sup>(图 3), 通过选择

合适的反应条件, 可以实现动态动力学拆分。Yamamoto 等<sup>[15]</sup>利用 *A. faecalis* ATCC8750 菌株的静息细胞中腈水解酶催化外消旋扁桃腈生产 R-扁桃酸, 产率为 91%, 产物 e.e.%大于 99%。许建和课题组<sup>[16]</sup>以乙腈为唯一氮源, 从土壤中筛选获得一株能催化外消旋的扁桃腈生产 R-扁桃酸的腈水解酶菌株 *Alcaligenes* sp. ECU0401, 产物 e.e.%大于 99%, 但是转化率较低。本课题组从土壤中筛选出一株扁桃腈水解酶菌种, 通过诱变育种, 得到一株遗传稳定的高活性突变株 *A. faecalis* ZJUTB10, 成功开发了立体选择性腈水解酶生物催化制备 R-扁桃酸的工艺, 转化率达到 90%以上, 产物 e.e.%大于 99%。该工艺已在企业完成生产性试验, 年产 100 吨的生产线即将投产。

2-芳基丙酸类非甾体消炎药萘普生、布洛芬、酮洛芬和非诺洛芬等的 C<sub>2</sub> 是手性碳原子, 对映体间的生

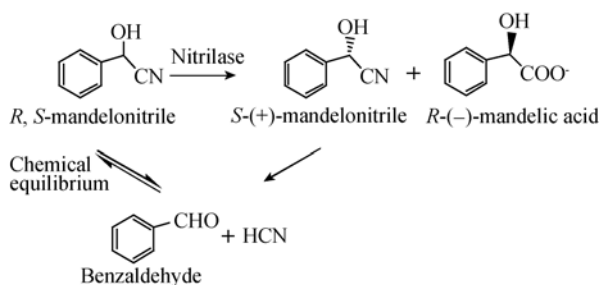


图3 腈水解酶生物催化外消旋的扁桃腈生产 *R*-扁桃酸  
Fig. 3 Enantioselective biocatalytic hydrolysis of racemic mandelonitrile for production of *R*-mandelic acid with nitrilase.

理活性相差较大,例如(*S*)-萘普生的活性是(*R*)-萘普生的 2715 倍, (*S*)-布洛芬的活性是(*R*)-布洛芬的 160 倍, (*S*)-非诺洛芬的活性是(*R*)-非诺洛芬的 35 倍。而这些 (*S*)-2-芳基丙酸类物质可以通过 *S*-腈水解酶催化其外消旋的芳基丙腈类物质得到(图 4)。利用 *Acinetobacter* sp. strain AK226 *S*-腈水解酶催化 2-(4-异丁基-苯基)丙腈生产(*S*)-布洛芬,光学纯度达到了 95%<sup>[17-19]</sup>。*R. rhodochrous* ATCC 21197 腈水解酶能水解外消旋的 2-芳基丙腈生成光学纯的 2-芳基丙酸。(*S*)-萘普生也可以通过该菌催化得到,光学纯度非常高<sup>[20]</sup>。

加巴喷丁(Gabapentin)是一种  $\gamma$ -氨基酸类药物,具有抗惊厥作用,主要用于治疗癫痫及多种神经性疼痛,在 50 多个国家获准销售,拥有庞大的市场份额。它的合成吸引了许多有机合成学者的注意,相

继成功开发了多种合成工艺。目前主要用化学合成法生产,但存在收率低等问题。Zhu 等<sup>[21]</sup>研究表明,采用腈水解酶作为催化剂,可以合成加巴喷丁的关键中间体 1-氰基环己烷乙酸(图 5),提高收率。

与临床上使用的加巴喷丁比较,美国 Pfizer 公司研发的另外一种  $\gamma$ -氨基丁酸受体激动普瑞巴林(Pregabalin)的抗惊厥作用更强,不良反应更小,具有剂量低、服用次数少、兼具抗焦虑作用。Burns 等发现采用腈水解酶作为催化剂(NIT-101, NIT-102, NIT-103, nitrilase 等)催化合成普瑞巴林的中间体, *R*-对映体可以循环利用,既提高了原料利用率,又可以使对映体的过量比最高达到 100%,为(*S*)-普瑞巴林的合成提供了中间体合成的有效途径<sup>[22]</sup>(图 6)。

利用腈水解酶生物催化还可以用于(*R*)-4-氰基-3-羟基丁酸(阿托伐他汀合成路线的关键中间体)的合成(图 7),初步筛选的腈水解酶可在 24 h 内把 3-羟基戊二腈完全转化为(*R*)-4-氰基-3-羟基丁酸,底物浓度为 3 mol/L 时产物 *e.e.*% 为 88%。通过基因位点饱和突变,把该酶第 190 位的丙氨酸变成组氨酸后,底物浓度为 3 mol/L 时,该酶能在 16 h 内将底物 100%转化,产物 *e.e.*% 高达 99%<sup>[23-25]</sup>。与化学法比较,优势明显。

左乙拉西坦(Levetiracetam)是比利时 UCB 公司开发的第 2 代乙酰胆碱激动剂,主要用于治疗局

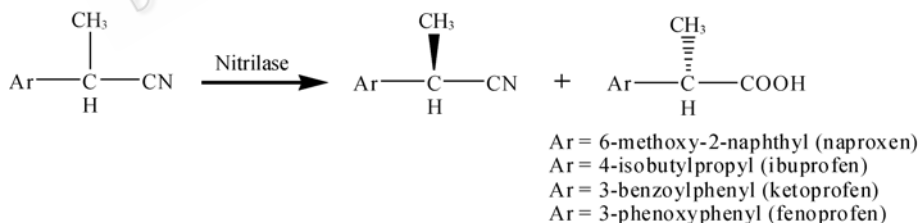


图4 腈水解酶选择性水解 2-芳基丙腈生产 2-芳基丙酸  
Fig. 4 Synthesis of 2-arylpropionic acid by enantioselective hydrolysis of 2-arylpropionitrile with nitrilase.

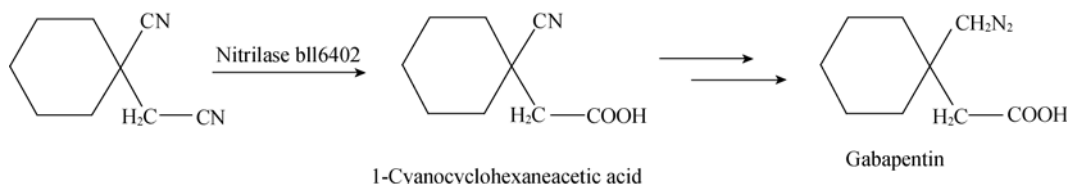


图5 腈水解酶用于加巴喷丁中间体 1-氰基环己烷乙酸的合成  
Fig. 5 Synthesis of gabapentin intermediate 1-cyanocyclohexaneacetic acid by nitrilases.

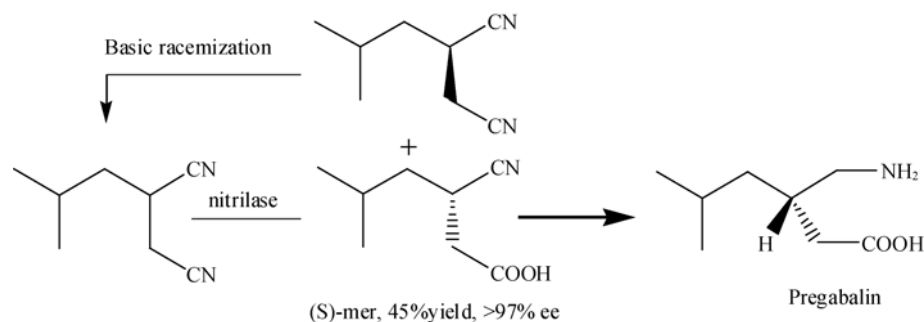


图 6 腈水解酶用于普瑞巴林中间体的合成

Fig. 6 Synthesis of pregabalin intermediate by nitrilase.

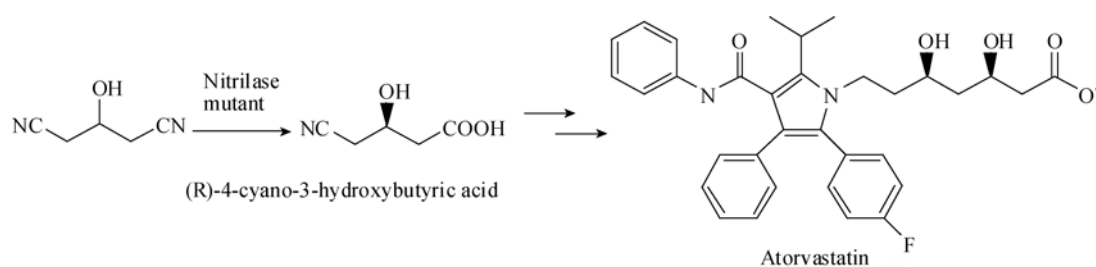


图 7 腈水解酶定向改造后用于阿托伐他汀中间体的合成

Fig. 7 Synthesis of atorvastatin intermediate by directed evolution nitrilase.

限性及继发性全身性癫痫, 2000 年 4 月获得美国 FDA 批准并在美国上市, 是目前报道的唯一具有预防癫痫发生的抗癫痫药物。其合成路线有两条, 一是以蛋氨酸为原料, 通过酯化、酰胺化、关环反应最后脱除硫甲基反应得到; 另一方法是以 (S)-氨基丁酰胺为原料经酰胺化关环反应制备得到。现有的生产方法包含有非对映体拆分的步骤, 收率低, 并且副产物 R-型异构体难以回收利用。另外, 还会用到危险化学品如烷基化试剂。最近, 腈水合酶生物催化技术生产左乙拉西坦的工艺得到了开发(图 8)<sup>[26]</sup>。在腈水合酶的催化下, 产率达到 100 g/(L·d), 收率达到 43%, 产物的 *e.e.*% 达到 94%, 副产物 R-型异构体可以回收利用。可以看出, 与化学法相比, 具有更高的原子经济性。

对甲氧基苯乙酸作为取代苯基乙酸的一种, 可用作为医药中间体用来生产新一代抗抑郁药物文拉法新和  $\beta_2$ -肾上腺受体激动剂类平喘药物富马酸福莫特罗、葛根等药物, 但目前芳基乙酸类化合物的生产方法主要采用化学法, 其生产过程反应步骤多, 周期长, 反应条件苛刻, 环境污染大。因此, 利用生物转化法具有较好的应用价值(图 9)。目前有报道 *R. butanica* ATCC 21197<sup>[27]</sup>和 *A. faecalis* JM3<sup>[28]</sup>能将

对甲氧基乙腈转化为对甲氧基乙酸, 前者水解过程是采用腈水合酶和酰胺酶的耦联, 会有副产物酰胺产生, 后者是一株芳基乙腈类腈水解酶菌株, 对甲氧基乙腈的催化活性较低。本课题组从土壤中筛选到一株腈水解酶产生菌 *B. subtilis* ZJB-063<sup>[12]</sup>, 并开发了固定化细胞生物催化对甲氧基苯乙腈生产对甲氧基苯乙酸的工艺。反应 17 批后, 酶活仍然为最初的 68.32%<sup>[29]</sup>。

## 2.2 在农药及中间体生产中的应用

亚氨基二乙酸(IDA)是合成除草剂草甘膦的重要中间体, IDA 路线是目前世界上生产草甘膦最主要的工艺, 而亚氨基二乙腈法由于原料廉价易得逐渐成为国内生产 IDA 的主导方法。传统的亚氨基二乙腈法制备 IDA 都是采用化学水解法。高温下, 在 NaOH 浓溶液中将亚氨基二乙腈水解生成亚氨基二乙酸二钠盐, 再用浓盐酸或浓硫酸酸化得到亚氨基二乙酸。这种方法不仅收率低、能耗高、反应条件苛刻、产生大量的无机盐, 而且对设备要求高、生产成本低、对环境污染严重。为此, 许多研究单位和机构都在开发能耗低、环境友好的 IDA 合成新工艺。利用酶法水解亚氨基二乙腈生产亚氨基二乙酸是可行的而且相当具有应用前景, 原理见图 10。与

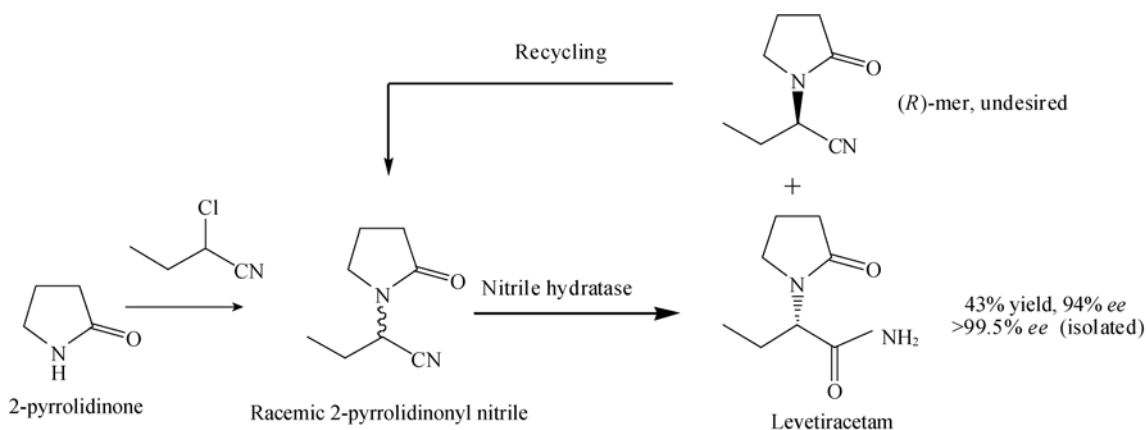


图 8 腈水解酶用于左乙拉西坦的合成

Fig. 8 Synthesis of levetiracetam by nitrile hydratase.

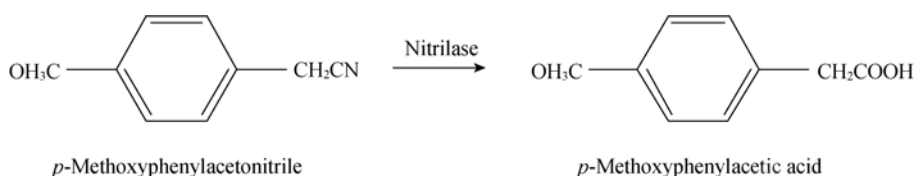


图 9 腈水解酶用于对羟基苯乙酸的合成

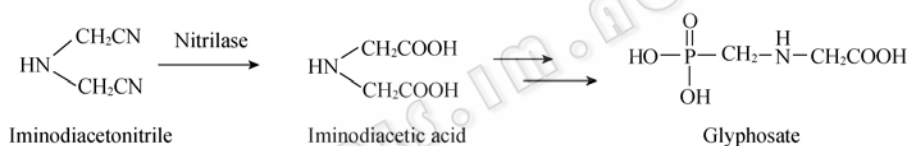
Fig. 9 Synthesis of *p*-methoxyphenylacetic acid by nitrilase.

图 10 腈水解酶催化亚氨基二乙腈生产草甘膦中间体亚氨基二乙酸

Fig. 10 Synthesis of glyphosate intermediate iminodiacetic acid by nitrilase.

新近报道的化学水解法制备亚氨基二乙酸工艺相比,生物催化法转化亚氨基二乙腈生成亚氨基二乙酸具有以下优势<sup>[32]</sup>: 1) 废水产量少。用化学水解法制备 1 吨亚氨基二乙酸如果用浓硫酸酸化至少产生废水 5 吨,用浓盐酸酸化至少产生废水 6 吨,而且废水中还含有  $\text{NH}(\text{CH}_2\text{COONa})_2$  和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  等难处理的盐类。如果用腈水解酶生物催化法生产亚氨基二乙酸,按已报道的腈水解酶活力(10 万单位/毫升发酵液,工业酶活定义: 在一定的条件下,1 min 内将 1  $\mu\text{g}$  的底物转化为产物所需的酶量为一个酶活单位),每次连续转化 5 批来计算,每升发酵液可转化 500 g 亚氨基二乙腈。由于酶法水解具有高效性和高底物特异性等特点,一般转化率和产率都可达 95% 以上。以此推算,每升发酵液可以转化生产亚氨基二乙酸 630 g 以上,每生产 1 吨亚氨基二乙酸的废水排放量不

到 2 吨,而且废水中难处理的杂质含量少,更利于实现清洁生产。2) 可溶性盐排放少。化学水解法生产过程中产生大量的可溶性盐类,不仅不利于产物提纯,而且加大了废水净化的难度,还容易腐蚀生产设备。采用生物催化法可溶性盐排放少,更容易提高产品质量,减小环境污染。3) 反应条件温和。化学水解法需要在 100 左右进行,必须配备加热和温控装置,反应条件苛刻,能耗高而且对设备要求高。而生物催化法一般都是在常温下进行,反应条件温和,设备成本相对较低。4) 反应时间短。化学水解法反应一批至少需要 5 h。而生物催化法催化反应速度快,单批反应一般都可以在 1 h 之内完成。目前,国内外尚无利用微生物腈水解酶水解亚氨基二乙腈的报道,生物转化法生产草甘膦中间体亚氨基二乙酸尚属空白。本课题组从土壤中筛选获得了高

产脞水解酶的微生物菌株, 并利用该菌株高效生物催化水解亚氨基二乙脞, 开发了生物法制备草甘脞中间体亚氨基二乙酸工艺<sup>[33]</sup>。

草铵脞是广谱、苗后、非选择性除草剂, 继草甘脞之后世界第二大转基因作物耐受除草剂, 市场前景十分广阔。草铵脞具有两种对映异构体, 但只有 *L*-构型具有除草活性。如果草铵脞产品能以 *L*-构型的纯光学异构体形式使用, 可使草铵脞的使用量降低 50%, 这对于提高原子经济性、降低使用成本、减轻环境压力都具有十分重要的意义。迄今为止, 化学法合成 *L*-草铵脞的报道较多, 但是这一类方法往往存在两个缺陷: 第一, 一般使用手性前体, 而且手性前体在后续反应中易消旋化; 第二, 化学法制备的 *L*-草铵脞的对映体过量值较低, 很难达到光学纯异构体的标准。因此, 利用酶催化剂选择性高、专一性强和过程简单等优势, 开发一种简捷、高效、绿色的生物制备方法将是今后生产 *L*-草铵脞的重要突破口和发展方向<sup>[34]</sup>。目前, 国内仍未成功地找出一条真正的工业化路线。本课题组研究开发了全新的化学-脞水解酶法耦合 *L*-草铵脞生产工艺(图 11)。该工艺从醛出发, 通过斯瑞克反应生成  $\alpha$ -氨基脞, 再经脞水解酶的选择性水解得到 *L*-草铵脞。

咪唑啉酮类除草剂以其选择性强、杀草谱广、环境安全、价格低廉等特点, 深受农民欢迎, 使用面积迅速扩大, 在世界农药市场上占有很重要的份额。2005 年, 我国仅黑龙江和内蒙古两省区大豆田该除草剂的用量就达 5000 吨(制剂)之多。含有 1 个甲基与异丙基的咪唑啉酮环是维持其具有较高生物活性的基本结构要求。该咪唑啉酮环由 2-氨基-2,3-二甲基丁酰胺的成环反应获得, 因此, 2-氨基-2,3-二甲基丁酰胺是制备咪唑啉酮类除草剂的通用关键中间体。随着今后相当长一段时间内对咪唑啉酮类除

草剂需求的日益旺盛, 相应地, 必将导致对 2-氨基-2,3-二甲基丁酰胺需求的大幅增加。目前, 2-氨基-2,3-二甲基丁酰胺的工业化生产均由 2-氨基-2,3-二甲基丁脞在强酸条件下, 通过化学水解法得到。该反应过程步骤多, 条件苛刻, 副产物多, 产物提取繁琐、收率低, 而且产生大量难处理含脞废水, 造成严重的环境污染。本实验室筛选得到高效生物催化剂脞水合酶催化 2-氨基-2,3-二甲基丁脞一步水合制备 2-氨基-2,3-二甲基丁酰胺(图 12), 可以克服化学水解法的诸多缺点, 实现该大吨位重要中间体的绿色生产。

2-芳氧基丙酸酯类化合物是一类高效防除禾本科杂草的除草剂, 也是一类发展较迅速、不断开发出新品种的除草剂类型, 由德国 Hoechst 公司首先开发。Bianchi 等<sup>[30]</sup>研究表明, 该产品也可以通过脞化物光学选择性水解得到(图 13)。整个过程包括一个快速的非选择性脞基水合酶作用步骤和一个慢速的光学选择性酰胺酶作用步骤。

5-氰基戊酰胺是合成除草剂 azafenidin 的起始物质。开发以二氧化锰为催化剂的己二脞化学水合法工艺产生了大量副产物己二酰胺(占被转化己二脞的 20%)(图 14), 己二脞的转化率为 25%, 而从未反应的己二脞中分离 5-氰基戊酰胺是一项十分困难的溶剂萃取操作。筛选作为己二脞水合催化剂的一系列微生物时发现了一些细菌包含一种脞水合酶, 它能选择性地由己二脞生产 5-氰基戊酰胺, 在己二脞转化率为 97%时, 5-氰基戊酰胺的最终产率为 93%, 选择性为 96%, 每千克生物催化剂(干细胞重)可生产 3150 kg 以上的 5-氰基戊酰胺。与以二氧化锰作为催化剂的工艺相比, 每生产 1 kg 5-氰基戊酰胺仅浪费 0.006 kg 生物催化剂(催化剂的浪费降低了 99.5%), 且其中有 93%的重量是水。用这一方法生产的 100 吨 5-氰基戊酰胺, 可减少 126 吨的催化剂使用量<sup>[31]</sup>。

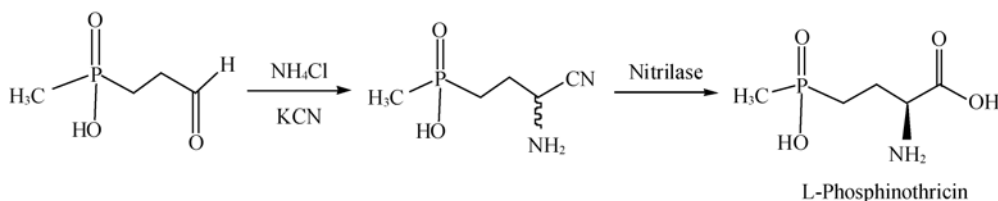


图 11 脞水解酶用于 *L*-草铵脞的合成

Fig. 11 Synthesis of *L*-phosphinothricin by nitrilase.

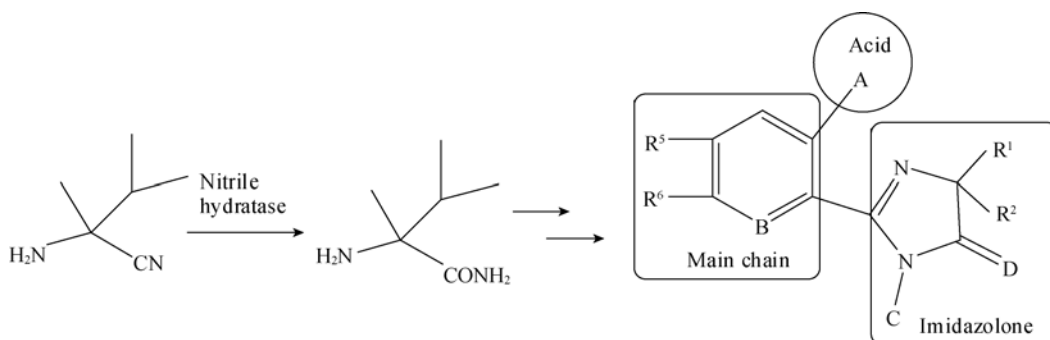


图 12 腈水合酶催化合成咪唑啉酮类除草剂的中间体 2-氨基-2,3-二甲基丁酰胺

Fig. 12 Synthesis of imidazolone intermediate 2-amino-2,3-dimethylbutanamide by nitrilase.

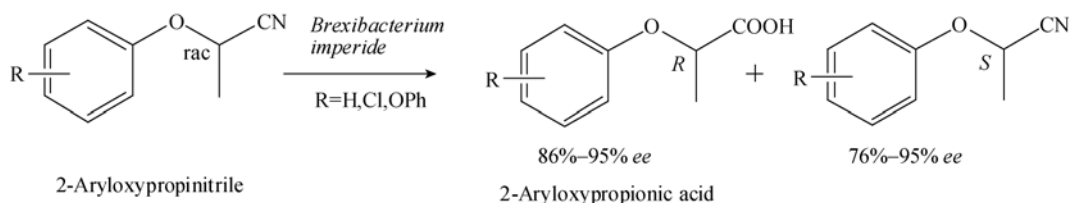


图 13 腈水解酶催化 2-芳氧基丙腈的对映选择性水解

Fig. 13 Synthesis of 2-aryloxypropionic acid by enantioselective enzymatic hydrolysis of 2-aryloxypropionitriles with nitrilase.

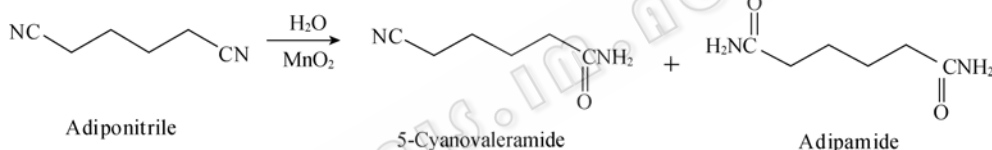


图 14 己二腈化学水合法工艺生产 5-氰基戊酰胺

Fig. 14 Chemical catalysts for the hydration of adiponitrile to 5-cyanovaleramide.

### 2.3 在食品、饲料添加剂生产中的应用

烟酰胺属 B 族维生素，参与碳水化合物、脂肪和蛋白质的代谢，用于治疗糙皮病等，还可以添加到食品和面粉中用以补充人体所需的维生素，其最大的应用领域是用作饲料添加剂。日东公司在成功开发了微生物法生产丙烯酰胺技术后不久即开发了微生物法生产烟酰胺技术，利用用于丙烯酰胺生产的腈水合酶高产菌种催化烟腈水合生产烟酰胺<sup>[35]</sup> (图 15)。瑞士 Lonza AG 公司是全球最大的烟酰胺生产企业，它利用日东公司的技术建立了全球第一个微生物法生产烟酰胺的工业装置，在中国的合资企业广州龙莎有限公司，建成了年产万吨的微生物法生产烟酰胺的生产装置<sup>[36]</sup>。上海市农药研究所也在微生物法丙烯酰胺生产技术开发成功之后开发了微生物法生产烟酰胺技术<sup>[37]</sup>，并建立了工业装置，实

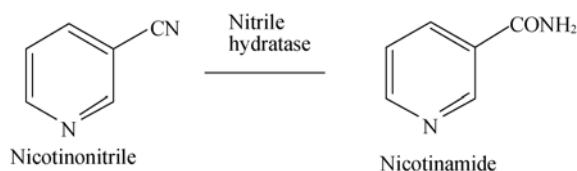


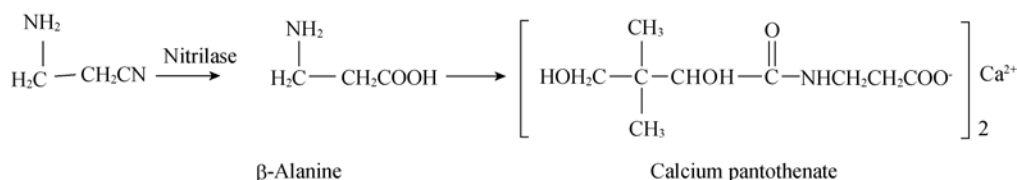
图 15 腈水合酶催化烟腈生产烟酰胺

Fig. 15 Nitrile hydratase hydrolysis of nicotinonitrile for production of nicotinamide.

现了规模化生产。该工艺腈水合酶活力高达 1000 万单位/毫升发酵液，转化率高达 99% 以上，同时大大简化产物分离提取工艺，产品纯度达 99.8% 以上。

$\beta$ -氨基丙酸是一种多用途有机原料，主要用于合成泛酸和泛酸钙，而泛酸产品在医药、食品、饲料工业中应用广泛。获取  $\beta$ -氨基丙酸的途径，可由丝胶、明胶、玉米蛋白等物质水解、精制而得，但原料来源有限，成本高，目前工业上主要通过化学方法



图 16 腈水解酶用于泛酸钙中间体  $\beta$ -氨基丙酸的合成Fig. 16 Synthesis of calcium pantothenate intermediate  $\beta$ -alanine by nitrilase.

生产, 主要为丙烯酸氨化法、丙烯腈氨化水解法及  $\beta$ -氨基丙腈水解法, 国内主要采用的是丙烯腈氨化水解法, 这些方法大多需要强碱强酸、高温、高压等条件, 而且产物纯化繁琐、存在“三废”排放量等问题。本课题组筛选到了含有催化  $\beta$ -氨基丙腈生产  $\beta$ -氨基丙酸的微生物 *Rhodococcus* sp. G20, 并优化了细胞催化的工艺<sup>[38]</sup>(图 16)。

2-羟基-4-甲硫基丁酸是蛋氨酸羟基类似物, 是生产上使用较多的一种补充蛋氨酸的添加剂, 现已广泛用于家禽和猪的饲料添加剂中。目前的制备方法: 将 2-羟基-4-甲硫基丁腈与强酸(如硫酸)反应, 用水稀释后, 升温完全水解, 然后用有机溶剂萃取 2-羟基-4-甲硫基丁酸。这种方法需要高温回流, 而且常伴随有大量盐类形成, 工业化过程中环境污染比较严重。法国的罗纳-普朗克动物营养素公司发明了一种腈水解酶催化 2-羟基-4-甲硫基丁腈制备 2-羟基-4-甲硫基丁酸的方法<sup>[39]</sup>, 通过在宿主微生物中表达高活性的腈水解酶, 然后将其固定化, 利用固定化腈水解酶作为催化剂生产 2-羟基-4-甲硫基丁酸(图 17), 底物 2-羟基-4-甲硫基丁腈的转化率达到 95%以上。

#### 2.4 在其他精细化学品生产中的应用

羟基乙酸是结构最简单的羟基酸, 广泛用于粘结剂、聚合物、清洁剂及电镀助剂等的生产。目前杜邦等公司开发的化学合成法对设备要求高, 腐蚀严重, 产品精制复杂。上海农药研究所薛建萍等<sup>[40]</sup>筛选的乳酪短杆菌 *Brevibacterium casei* CGMCC No.0887 经过长期的诱变育种, 每毫升发酵液中的腈水解酶活力单位可达到 10 万单位, 转化率达到 99%以上, 实现了规模化生产(图 18)。该工艺避免了强酸热解的苛刻条件, 腈水解酶法转化羟基乙腈生产羟基乙酸由于反应条件温和及反应的高效性, 在工业生产中明显优于化学合成法。

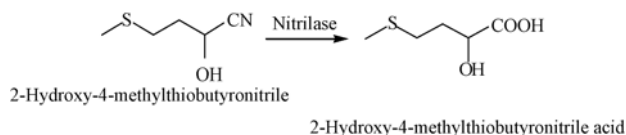
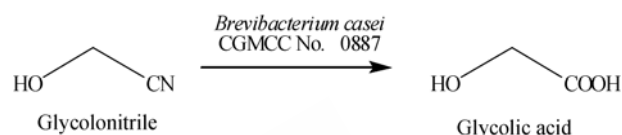


图 17 腈水解酶用于 2-羟基-4-甲硫基丁酸的合成

Fig. 17 Synthesis of 2-hydroxy-4-methylthiobutyric acid by nitrilase.

图 18 利用 *Brevibacterium casei* CGMCC No. 0887 生产羟基乙酸Fig. 18 Production of glycolic acid by *Brevibacterium casei* CGMCC No. 0887.

杜邦公司也开发了一套工业化生产过程, 将 2-甲基戊二腈(MGN, 己二腈制造尼龙-66 过程中产生的副产物)转化为 1,5-二甲基-2-哌啶酮(1,5-DMPD)。1,5-二甲基-2-哌啶酮在电子学、涂层及溶剂应用中具有令人满意的特性。MGN 首先用固定化的含腈水解酶的微生物细胞催化剂(*A. facilis* 72W) 水解为 4-氰基戊酸(4-CPA)铵盐<sup>[41]</sup>(图 19)。水解反应的选择性大于 98%, 转化率为 100%, 能得到二分之一氰基羧酸铵盐, 产生 1%~2%的唯一反应副产物 2-甲基戊二酸二铵盐<sup>[42-43]</sup>。与一个由 MGN 加氢直接转化为 1,3-DPMD 和 1,5-DMPD 混合物的化学工艺相比, 化学-酶法生产工艺产量高、产生的浪费较少, 并生成单一的内酰胺异构体。

丙烯酸在工业上主要用来生产丙烯酸酯类, 占丙烯酸总消费量的 62%左右, 应用于建筑、造纸、皮革、纺织、塑料加工、包装材料、日用化工、水处理、采油、冶金等领域。在精细化工领域占有相当重要的地位。用丙烯酸生产的聚丙烯和丙烯酸共聚物, 用作分散剂、絮凝剂、增稠剂、高吸水树脂和

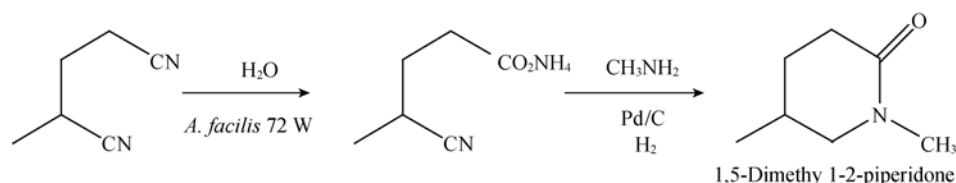


图 19 利用 *A. facilis* 72W 生产 1,5-二甲基-2-哌啶酮

Fig. 19 Production of 1,5-dimethyl-2-piperidone by *A. facilis* 72W.

助洗涤剂。目前全世界范围内普遍采用丙烯两步氧化法，即丙烯与空气在复合金属氧化物催化剂作用下先被氧化为丙烯醛，丙烯醛再被氧化为丙烯酸。另外，丙烯酸的生产还可以采用丙烯腈水解法，但是该方法需要大量的使用硫酸，并产生大量的硫酸废弃物。甲基丙烯酸用于生产有机玻璃和模塑料，还广泛地用于制造其他产品，如涂料、粘合剂、改性剂、润滑剂、浸透剂、上光剂、印染助剂、绝缘材料及高档轿车漆等。甲基丙烯酸工业生产主要采用丙酮氰醇法，该方法中，该法生产工艺流程长，涉及原料多，该过程还存在诸如要用剧毒氢氰酸和高腐蚀性硫酸和烧碱作为原料，并且副产大量的硫酸盐废弃物等缺点，其原子利用率仅为 27%，非常需要新的代替方法。从环保、经济和社会的要求看，丙烯酸和甲基丙烯酸生产工艺的绿色化显得非常迫切。腈转化酶能够将甲基丙烯腈水解为甲基丙烯酸，或将丙烯腈水解为丙烯酸，不会产生当使用硫酸来生产该产品时产生的硫酸铵废液。Nagasawa 等<sup>[44]</sup>研究了 *R. rhodochrous* J1 腈水解酶生物催化生产丙烯酸和甲基丙烯酸，当丙烯腈的浓度高于 200 mmol/L 时，对腈水解酶有较强的抑制作用，与丙烯酸的生产相比，甲基丙烯腈催化生产甲基丙烯酸的转化率低，利用流加底物丙烯腈和甲基丙烯腈的方法，丙烯酸和甲基丙烯酸的累积浓度达到 390 g/L 和 260 g/L。美国杜邦公司经过多年的研究，发现了一株同时产腈水合酶和酰胺酶的微生物羧基酮假单胞菌 *Comamonas testosterone* 5-MGAM-4D，该微生物中所含的腈转化酶能高专一性地将丙烯腈水解为丙烯酸，以及将甲基丙烯腈水解为甲基丙烯酸。0.76 g 湿菌体悬浮在 5.16 mL 蒸馏水中，加入 40.2 mg 甲基丙烯腈进行转化，2 h 后，甲基丙烯酸的收率为 100%，没有甲基丙烯酰胺和甲基丙烯腈剩余<sup>[45]</sup>。上海农药研究所利用筛选的乳酪短杆菌 *Brevibacterium casei*

CGMCC No. 0887 催化丙烯腈生产丙烯酸，采用底物流加的方法，产物丙烯酸累积的浓度达到了 3 mol/L<sup>[46]</sup>。最近，本课题组从土壤中筛选到一株能催化丙烯腈生产丙烯酸的含腈水解酶微生物 *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99 菌株，该微生物具有较好的热稳定性，在最适条件下，腈水解酶活性的半衰期长达 129.8 h<sup>[47]</sup>。并进行了固定化细胞催化丙烯腈生产丙烯酸的研究，用经过强化的海藻酸钠固定化细胞作为催化剂，可以连续转化 20 批次，活力没有明显下降<sup>[48]</sup>。

### 3 结束语及展望

精细化学品工业约占全球化学品产值的 20% 左右，向来是世界各国化学工业发展的战略重点，并在很大程度上反映了一个国家化学工业的集约化程度和经济发展水平。为增强竞争力、提高经济效益和解决精细化工发展的能源短缺、资源浪费 and 环境保护等问题，新技术新工艺在精细化工中的开发应用成为关键。基于微生物关键酶的生物催化技术的引入为精细化学品的蓬勃发展注入了新的活力，成为该领域再度腾飞的决定性因素。据著名的精细化学品生产商 Evonik 公司预测，生物催化和生物转化技术在精细化学品中的应用比重到 2010 年将会上升至 60%，市场潜力达到 4000 亿美元<sup>[49]</sup>。因此，通过酶催化剂将化学合成的前体、潜手性化合物等低附加值产品转化成单一光学活性医药、农药、食品添加剂、功能性材料前体和日用化学品等对于我国精细化工行业的可持续发展具有重要意义。生物催化已经成为国外著名医药、化学公司发展和投资的重点，如 BASF、DSM、Nitto、Lonza、DuPont、Degussa 等公司均在生物催化领域投入巨资和庞大的科技力量，并已经取得了骄人的成绩。分别有不同

的精细化学品采用生物催化工艺进行工业生产。经过多年的发展, 我国的精细化学品工业已具有相当的规模, 成为化学工业的重要组成, 部分产品的产量和技术水平达到世界第一。但是我国面临的一个重大问题是环境污染问题, 精细化工产业对生态环境造成的影响是非常突出的, 平均生产 1 吨精细化学品要产生 5~50 吨的副产物。事实证明以破坏环境为代价发展经济并非长远之计, 必须走化工生产绿色化和可持续发展道路。具有腈转化酶的微生物催化剂可以将腈转化为专用化学品、农用化学品或医药中间体等精细化学品。腈水合酶和腈水解酶为腈的水合或水解提供了独特的方法, 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<sup>[50-51]</sup>。更重要的是可以实现一般化学转化所不具有的优良的化学、区域及立体选择性, 在精细化学品的合成中表现出巨大的应用潜力<sup>[52]</sup>。

腈水合酶生物催化生产大宗化学品丙烯酰胺已成为酶工程领域产业化的成功范例, 腈转化酶生产精细化学品作为更高的技术平台正在快速崛起。尽管腈转化酶已用于多种精细化学品的合成, 如国内王梅祥课题组研究了红球菌 *Rhodococcus erythropolis* AJ270 立体选择性催化水解多种  $\alpha$ -手性中心外消旋腈, 如  $\alpha$ -烷基芳乙腈、 $\alpha$ -氨基腈、环丙烷基腈、环氧丙烷基腈、氮杂环丙烷基腈等的水解反应, 生成相应的手性酰胺及羧酸, 本课题组建立了腈转化酶酶库, 开发了多种腈转化酶工程产业化技术等, 但腈的酶法水解在精细化学品合成中的应用还大有潜力。还应该充分利用腈转化酶生物转化法的优势, 开拓新的腈转化酶生物催化生产新产品尤其是复杂精细化学品的研究, 以下几个方面将是研究的重点: 1) 从自然界中筛选和发现新的腈转化酶微生物。目前人类所发现的微生物不到自然界微生物总数的 0.1%~1%, 新酶的发现无疑是生物催化技术创新的源头, 知识产权保护的核心和产业化应用的关键。因此, 丰富的微生物资源为发现酶催化机理的多样性和实施适应性改造提供了新颖的酶源, 也为开辟绿色、高效的精细化学品制造新工艺奠定了基础。2) 开展腈转化酶的构效研究及分子合

理设计与定向进化。对于从自然界中筛选出来的腈转化酶在应用上受到一定的限制, 这些限制腈转化酶应用的因素包括对非天然底物的催化缓慢, 酶的稳定性低, 对温度、酸碱度等操作参数改变的耐受能力低, 在非水相中的活力低等。利用现代分析技术, 获得腈转化酶分子特征、空间结构、结构和功能的关系, 在此基础上, 通过定点突变等手段对腈转化酶进行改造, 提高酶的稳定性、活性或改变底物的专一性。3) 通过腈转化酶合成调节的研究, 更好控制产酶过程以得到廉价的腈转化酶生物催化剂。4) 研究利用新型生物高分子材料实现腈转化酶的固定化, 以提高固定化细胞和腈转化酶的使用寿命, 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。

利用微生物产生的转化酶对腈进行催化水合反应, 使其转变成相应的酰胺或者酸, 这一路线因其具有较高的经济价值和学术价值受到人们的关注。精细(手性)化学品生产的腈转化酶和催化过程研究是腈转化酶工程的新领域, 可实现腈转化酶的新跨越。大力开展酶催化腈水解反应的研究, 将会有更多的精细化学品通过腈转化酶的生物催化技术实现大规模生产, 促进经济增长方式的转变, 给我国传统的精细化工行业带来新的革命, 同时为酶工程的发展带来新的机遇。

## REFERENCES

- [1] Singh R, Sharma R, Tewari N, *et al.* Nitrilase and its application as a 'green' catalyst. *Chem Biodivers*, 2006, 3(12): 1279-1287.
- [2] Martinkova L, Mylerova V. Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. *Curr Org Chem*, 2003, 7(13): 1279-1295.
- [3] Banerjee A, Sharma R, Banerjee UC. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(1/2): 33-44.
- [4] Wang MX. Enantioselective biotransformations of nitriles in organic synthesis. *Top Catal*, 2005, 35(1/2): 117-130.
- [5] Chen J, Zheng RC, Zheng YG, *et al.* Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides. *Adv Biochem Eng/Biotechnol*, 2009, 113: 33-77.
- [6] Kobayashi M, Shimizu S. Nitrile hydrolases. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, 4(1): 95-102.
- [7] Harper DB. Purification and properties of an unusual

- nitrilase from nocardia N.C.I.B. 11216. *Biochem Soc Trans*, 1976, **4**(3): 502–504.
- [8] Zhu Q, Fan A, Wang YS, *et al.* Novel sensitive high-throughput screening strategy for nitrilase-producing strains. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**: 6053–6057.
- [9] Zheng RC, Zheng YG, Shen YC. A screening system for active and enantioselective amidase based on its acyl transfer activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**: 256–262.
- [10] Hu JG, Wang YJ, Zheng YG, *et al.* Isolation of glycolonitrile-hydrolyzing microorganism based on colorimetric reaction. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **41**(3): 244–249.
- [11] Jin SJ, Zheng RC, Zheng YG, *et al.* R-enantioselective hydrolysis of 2, 2-dimethylcyclopropanecarboxamide by amidase from a newly isolated strain *Brevibacterium epidermidis* ZJB-07021. *J Appl Microbiol*, 2008, **105**(4): 1150–1157.
- [12] Zheng YG, Chen J, Liu ZQ, *et al.* Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, a versatile nitrile-converting bacterium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **77**(5): 985–993.
- [13] Zheng RC, Zheng YG, Shen YC. Enantioseparation and determination of 2,2-dimethylcyclopropanecarboxamide and corresponding acid in the bioconversion broth by gas chromatography. *Biomed Chromatogr*, 2007, **21**(6): 610–615.
- [14] Yadav GD, Sivakumar P. Enzyme-catalysed optical resolution of mandelic acid via RS(-/+)-methyl mandelate in non-aqueous media. *Biochem Eng J*, 2004, **19**(2): 101–107.
- [15] Yamamoto K, Oishi K, Fujimatsu I, *et al.* Production of R(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC-8750. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(10): 3028–3032.
- [16] He YC, Xu JH, Xu Y, *et al.* Biocatalytic synthesis of (R)-(-)-mandelic acid from racemic mandelonitrile by a newly isolated nitrilase-producer *Alcaligenes* sp. ECU0401. *Chin Chem Lett*, 2007, **18**(6): 677–680.
- [17] Yamamoto K, Ueno Y, Otsubo K, *et al.* Production of S-(+)-ibuprofen from a nitrile compound by *Acinetobacter* sp. strain-AK226. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(10): 3125–3129.
- [18] Takagi M, Shirokaze JI, Oishi K, *et al.* Production of S-(+)-ibuprofen with high optical purity from a nitrile compound by cells immobilized on cellulose porous beads. *J Ferment Bioeng*, 1994, **78**(2): 191–193.
- [19] Takagi M, Oishi K, Ishimura F, *et al.* Production of S-(+)-ibuprofen from a nitrile compound by enzymatic-reaction combined with ultrafiltration. *J Ferment Bioeng*, 1994, **78**(1): 54–58.
- [20] Kakeya H, Sakai N, Sugai T, *et al.* Microbial hydrolysis as a potent method for the preparation of optically-active nitriles, amides and carboxylic-acids. *Tetrahedron Lett*, 1991, **32**(10): 1343–1346.
- [21] Zhu D, Mukherjee C, Biehl ER, *et al.* Nitrilase-catalyzed selective hydrolysis of dinitriles and green access to the cyanocarboxylic acids of pharmaceutical importance. *Adv Synth Catal*, 2007, **349**: 1667–1670.
- [22] Burns MP, Weaver JK, Wong JW. Stereoselective enzymic bioconversion of aliphatic dinitriles into cyano carboxylic acids: US, 0196905 A1, 2007-08-23.
- [23] DeSantis G, Zhu ZL, Greenberg WA, *et al.* An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(31): 9024–9025.
- [24] DeSantis G, Wong K, Farwell B, *et al.* Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis (GSSM). *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(38): 11476–11477.
- [25] Bergeron S, Chaplin D, Edwards JH, *et al.* Nitrilase-catalyzed desymmetrization of 3-hydroxyglutaronitrile: preparation of a statin side-chain intermediate. *Org Proc Res Dev*, 2006, **10**: 661–665.
- [26] Tao JH, Xu JH. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, **13**(1): 43–50.
- [27] Kakeya H, Sakai N, Sugai T, *et al.* Preparation of enantiomerically enriched compounds by using enzymes. 11. Preparation of optically-active alpha-hydroxy acid-derivatives by microbial hydrolysis of cyanohydrins and its application to the synthesis of (R)-4-dodecanolide. *Agric Biol Chem*, 1991, **55**(7): 1877–1881.
- [28] Nagasawa T, Mauger J, Yamada H. A novel nitrilase, arylacetone nitrilase, of *Alcaligenes faecalis* jm3-purification and characterization. *Eur J Biochem*, 1990, **194**(3): 765–772.
- [29] Chen J, Zheng YG, Shen YC. Biosynthesis of p-methoxyphenylacetic acid from p-methoxyphenylacetone nitrile by immobilized *Bacillus subtilis* ZJB-063. *Process Biochem*, 2008, **43**(9): 978–983.
- [30] Bianchi D, Bosetti A, Cesti P, *et al.* Stereoselective microbial hydrolysis of 2-aryloxypropionitriles. *Biotechnol Lett*, 1991, **13**(4): 241–244.
- [31] Hann EC, Eisenberg A, Fager SK, *et al.* 5-cyanovaleramide production using immobilized *Pseudomonas chlororaphis* B23. *Bioorg Med Chem*, 1999, **7**(10): 2239–2245.
- [32] Lin ZJ, Zheng RC, Lou YY, *et al.* Perspective of chemosynthesis methods of glyphosate and biosynthesis of glyphosate intermediate. *Agrochemicals*, 2009, **48**(8): 547–551.
- 林志坚, 郑仁朝, 楼亿园, 等. 草甘膦化学合成工艺及其中间体的生物法合成技术展望. *农药*, 2009, **48**(8): 547–551.
- [33] Zheng YG, Liu ZQ, Xue, JM, *et al.* Production of iminodiacetic acid by biocatalysis and its strain: CN, 101392276 A1. 2009-03-25.
- 郑裕国, 柳志强, 徐建妙, 等. 微生物催化法生产亚氨基二乙酸及其菌株. CN, 101392276 A1. 2009-03-25.
- [34] Lou YY, Lin ZJ, Zheng RC, *et al.* Progresses in biosynthesis of L-phosphinothricin. *Modern Agrochem*, 2009, **8**(3): 1–5.

- 楼亿圆, 林志坚, 郑仁朝, 等. 生物法合成 *l*-草铵膦的研究进展. *现代农药*, 2009, **8**(3):1-5.
- [35] Nagasawa T, Mathew C, Mauger J, *et al.* Nitrile hydratase-catalyzed production of nicotinamide from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(7): 1766-1769.
- [36] Chassin C. A biotechnological process for the production of nicotinamide. *Chim Oggi-Chem Today*, 1996, **14**(1/2): 9-12.
- [37] Shen YC, Xue JP, Li HB, *et al.* Production of nicotinamide by microbial method: CN, 1730660 A. 2004-08-05.  
沈寅初, 薛建萍, 李还宝, 等. 微生物法生产烟酰胺: CN, 1730660 A. 2004-08-05.
- [38] Liang LY, Zheng YG, Shen YC. Optimization of beta-alanine production from beta-aminopropionitrile by resting cells of *Rhodococcus* sp. G20 in a bubble column reactor using response surface methodology. *Process Biochem*, 2008, **43**(7): 758-764.
- [39] Favre-Bulle O, Pierrard J, David C, *et al.* Industrial scale process for the preparation of 2-hydroxy-4-methylbutyric acid using a nitrilase: US, 6180359 B1, 2001-07-30.
- [40] Xue JP, Luo JX, Li HB, *et al.* Production of glycolic acid by biocatalysis: CN, 1772912 A. 2006-05-17.  
薛建萍, 罗积杏, 李还宝, 等. 生物催化生产羟基乙酸: CN, 1772912 A. 2006-05-17.
- [41] Gavagan JE, DiCosimo R, Eisenberg A, *et al.* A gram-negative bacterium producing a heat-stable nitrilase highly active on aliphatic dinitriles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**(5): 654-659.
- [42] Gavagan JE, Fager SK, Fallon RD, *et al.* Chemoenzymic production of lactams from aliphatic alpha, omega-dinitriles. *J Org Chem*, 1998, **63**(14): 4792-4801.
- [43] Cooling FB, Fager SK, Fallon RD, *et al.* Chemoenzymatic production of 1,5-dimethyl-2-piperidone. *J Mol Catal B-Enzym*, 2001, **11**(4-6): 295-306.
- [44] Nagasawa T, Nakamura T, Yamada H. Production of acrylic-acid and methacrylic-acid using *Rhodococcus-rhodochrous*-J1 nitrilase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **34**(3): 322-324.
- [45] Dicosimo R, Fallon RD, Gavagan JE, *et al.* Method for producing methacrylic acid acrylic acid with a combination of enzyme catalysts: US, 6670158 B2. 2003-12-30.
- [46] Xue JP, Shen YC. Production of acrylic acid by biocatalysis: CN, 101082052 A. 2007-12-05.  
薛建萍, 沈寅初. 生物催化法生产丙烯酸: CN, 101082052 A. 2007-12-05.
- [47] Shen M, Zheng YG, Shen YC. Isolation and characterization of a novel *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99, capable of converting acrylonitrile to acrylic acid. *Process Biochem*, 2009, **44**(7): 781-785.
- [48] Shen M, Zheng YG, Liu ZQ, *et al.* Production of acrylic acid from acrylonitrile by immobilization of *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, **19**(6): 582-587.
- [49] Mirasol F. Biocatalysis increasingly used for chiral molecule production in pharmaceuticals and fine chemicals. <http://www.icis.com>. 2008-01-28.
- [50] Panke S, Held M, Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(4): 272-279.
- [51] Straathof AJJ, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**(6): 548-556.
- [52] Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *TetraAsym*, 2009, **20**(5): 513-557.