D-泛解酸内酯及其酶法合成的研究进展

王 睿[1,2]，孙晶晶[1]，王 伟[1]，江承程[1]，王超凡[1,2]，郝建华[1*]

（1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部极地渔业可持续利用重点实验室，山东 青岛 266071；
2. 上海海洋大学 水产与生命学院，上海 201306）

摘 要 D-泛解酸内酯（D-pantolactone，D-PL）是一种重要的手性中间体，主要用于合成 D-泛酸即维生素 B_5 及其衍生物。目前，全球对于 D-泛解酸内酯的需求量仍在不断上升，因此开发高效、环保的生产路线具有重要意义。酶法合成 D-泛解酸内酯被认为是一条具有广阔生产前景的合成路线，具有绿色、环保等特点，也是目前工业生产的主要方法。本文综述近年来酶法合成 D-泛解酸内酯的研究进展，讨论了不同反应条件下 D-泛解酸内酯水解酶（D-lactono hydrolase，D-Lac）的酶学性质、表达与定向进化，以及不对称还原酮基泛解酸内酯的研究进展，比较了化学法、直接发酵法与生物酶法的优势，为后续设计生产 D-泛解酸内酯及其衍生物的方法提供参考。

关键词 D-泛解酸内酯；D-泛解酸内酯水解酶；共轭聚酮还原酶；不对称还原；酶学性质；定向进化

中图分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1005－7021（2026）03－0102－11

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.03.009

Research Progress on the Enzymatic Synthesis of D-pantolactone

WANG Rui[1,2], SUN Jing-jing[1], WANG Wei[1], JIANG Cheng-cheng[1], WANG Chao-fan[1,2], HAO Jian-hua[1*]

（1. *Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao* 266071; 2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306）

Abstract D-Pantolactone serves as a pivotal chiral intermediate in the synthesis of D-pantothenic acid (vitamin B_5) and its derivative compounds. Given the escalating global demand for D-pantolactone, the development of efficient and environmentally benign production routes has emerged as a critical research focus. Enzymatic synthesis of D-pantolactone stands out as a highly promising approach, distinguished by its green and eco-friendly attributes, and has become the predominant method in industrial production. This comprehensive review delves into the recent advancements in the enzymatic synthesis of D-pantolactone. It meticulously examines the enzymatic properties, expression, and directed evolution of D-pantolactone hydrolase under different experimental conditions. Additionally, it explores the latest progress in the asymmetric reduction of keto-pantolactone. By comparing the merits of various synthesis methods, this review offers valuable insights and guidance for the future design of production strategies for D-pantolactone and its derivatives.

Keywords D-pantolactone; D-pantolactone hydrolase; conjugated polyketone reductase; asymmetric reduction; enzymatic properties; directed evolution

泛酸，又称遍多酸、维生素 B_5，是一种水溶性维生素，在生物界中普遍存在，因此得名“泛酸”。泛酸只有 D 型具有生理作用，是合成辅酶 A 的一种前体物质[1-2]，也被认为是辅酶 A 的辅酶，1933 年在肝脏中被首次发现，并于 1940 年成功合成[3]。研究表明，泛酸与机体能量代谢、免疫调

基金项目：山东省泰山产业领军人才蓝色专项（tsls20231207）；中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目（2023TD71）

作者简介：王睿 男，硕士研究生。研究方向为海洋产物资源与酶工程。E-mail：1174975949@qq.com

* 通讯作者。男，研究员，博士，博士生导师。研究方向为海洋产物资源与酶工程。E-mail：haojh@ysfri.ac.cn

收稿日期：2025-08-06

节、神经递质合成和肠道健康等密切相关。由于泛酸的不稳定性，市售产品主要以泛酸钙的形式进行销售，广泛应用于饲料、化妆品、医药等行业。全球每年对于泛酸的需求量超过 2 万 t。目前，制备 D-泛酸（D-Pantothenic Acid，D-PA）的方法包括化学法、直接发酵法、生物酶法等。早期的化学制备方法主要通过异丁醛-甲醛-氰化钠法或乙醛酸-异丁醛法制备泛酸内酯，然后将其与 β-丙氨酸钙进行缩合，制得 DL-泛酸钙[4-5]，但该方法因试剂拆分成本高、分离困难、污染严重等问题，目前尚未有大规模生产的报道。直接发酵法由于生产的泛酸成分混杂，难以通过离子交换、结晶等方式去除杂质，也尚未应用到工业生产中[6]。现有的投产实例大部分采用微生物酶法进行大规模 D-PA 生产。酶是一种高效、经济、安全的生物催化剂，微生物酶法合成泛酸的重点先是生成其前体物质 D-泛解酸内酯（D-pantolactone，D-PL），再经过一系列反应后生成 D-PA。D-PL 生成通常有两种路径，一种是通过氧化还原酶不对称还原酮泛解酸内酯（Ketopantolactone，K-PL），直接将 K-PL 转化为 D-PL（图 1）。Shimizu 等[6]首次报道了这一方法。虽然该方法操作简单，但在反应过程中必须使用还原型辅酶Ⅱ（Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase，NADPH）作为还原剂，成本过高[7]。另外该过程需要在生物体内完成，所以需要在生物体内加入葡萄糖等碳水化合物提供能量，且反应时间较长，需要 3 d，而且底物浓度过低，仅为 5%[2]，因此，暂时没有不对称还原法应用于工业生产的报道。但是近年来随着研究的深入，不对称还原法逐渐克服了这些缺点，有望在未来实现 D-PL 工业化生产。第二种路径是利用微生物酶对 DL-泛解酸内酯（DL-pantolactone，DL-PL）的高选择性水解实现 D-PL 生产。早期研究人员提出，可以使用高专一性的 L 型水解酶进行催化反应，专一性地水解 L-泛解酸内酯[8-9]，生成 L-泛解酸（L-pantoic acid，L-PA）（图 2），并且 L-PA可以回收[10]，在此基础上，进一步利用DL-PL水解，获得高纯度的 D-PL。但是，该过程需要完全催化，才能得到较高 D-PL 产率。而且该方法最少会损失一半的 DL-PL 原料，因此成本较高，未实现大规模生产。针对这一难题，研究人员筛选出可以专一性水解 D-PL 的微生物。Sakamoto 课题组首先发现利用从镰孢菌属（*Fusarium*）、柱孢菌属（*Cylindrocarpon*）和赤霉菌属（*Gibberella*）中得到的 D-泛解酸内酯水解酶（D-lactono hydrolase，D-Lac）可以高效降解其中的 D-PL[11-12]（图 3），且产于镰孢菌的酶活性更强。利用尖刀镰孢菌（*Fusarium oxysporm*）等微生物对混旋体中的D-PL进行水解，可得到 D-泛解酸（D-pantoic acid，D-PA，因与D-泛酸缩写相同，为表示区别，下文未特别表述的 D-PA 均为 D-泛解酸），再经高温处理得到 D-PL。

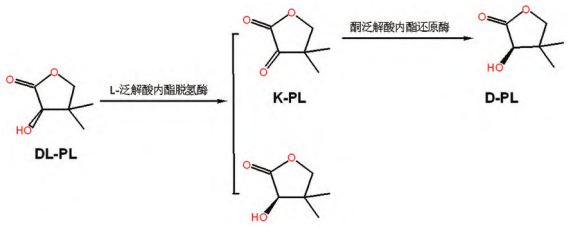


图 1　氧化还原酶法合成路线[6]

Fig. 1　Oxidoreductase-catalyzed synthetic route[6]

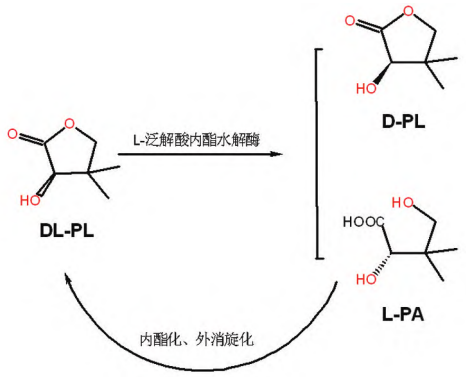


图 2　L-泛解酸内酯水解酶催化反应[6]

Fig. 2　Catalytic reaction of L-lactonohydrolase[6]

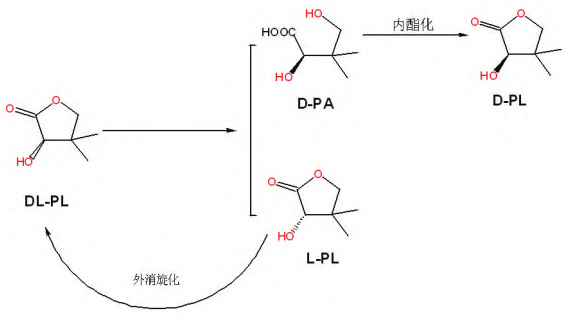


图 3　D-泛解酸内酯水解酶催化反应[6]

Fig. 3　Catalytic reaction of D-lactonohydrolase[6]

1 泛解酸内酯概述及合成策略

泛解酸内酯(Pantolactone,PL)是一类典型的光学异构体,仅 D 型(D-PL)具有生物活性,其化学结构为 $C_6H_{10}O_3$,是泛酸(维生素 B_5)合成的关键中间体[13],也是现代生物合成工业生产的关键物质。D-PL 主要由 β-Ala 与 D-泛解酸合成,也可以用手性拆分方法获得。近几十年来,科研人员投入大量精力研究生产 D-PL 的新路径,目前全球 D-PL 的年需求量约为 27 000 t,且仍在不断增加。目前报道的生产 D-PL 的方法主要有三种,除上述 DL-PL 选择性水解、K-PL 不对称还原方法外,第三种途径是直接使用手性底物、手性试剂、手性辅助试剂进行不对称构建和不对称小分子催化[14]的工业化合成方法,该方法程序繁琐、复杂且耗时,市场需求仍未得到满足,从而限制了其大规模应用。因此,迫切需要更有效的策略来合成 D-PL[15]。

2 DL-PL 的化学合成路径

DL-PL 是 1904 年由 Glaser[16]首次利用异丁醛和甲醛之间的羟醛缩合反应合成了中间体 3-羟基-2,2-二甲基丙醛(hpa),然后加入 HCN 或 NaCN 得到 2,4-二羟基-3,3-二甲基丁腈,在酸性条件下皂化得到 DL-PL(图 4)。1940 年,Stiller 等[17]改进了这条较早的路线,提高了 DL-PL 产量。该方法工艺成熟、价格低廉,是目前最主要的 DL-PL 生产方法,但生产过程中使用了剧毒的 HCN 或 NaCN。2019 年 Bourgeois 等[18]开发了一种新方法,该方法利用异丁醛和乙醛之间的羟醛缩合得到中间体 2-羟基-3,3-二甲基-4-氧代丁酸酯,然后还原得到 DL-PL,从而避免使用 NaCN 或 HCN。

3 D-泛解酸内酯水解酶(D-Lac)的来源与前期研究

生物催化和酶反应是目前公认的可持续技术,生物酶法拆分 DL-PL 是一种高效、经济、绿色的合成途径。D-Lac 是一种高专一性水解酶,自 1994 年被发现和应用后,人们对它进行了深入的研究。目前对于 D-Lac 的研究主要集中在酶学性质以及定向进化方面,本研究也将从这两方面进行介绍。使用尖刀镰孢菌细胞作为催化剂时[19],在不改变 L-PL 的前提下,催化 D-PL 生成 D-PA。1998 年 Kobayashi 等[20]对一种产自尖刀镰孢菌 AKU3702 的水解酶进行了基因组提取,并将扩增得到的 cDNA 产物在大肠埃希菌(*Escherichia coli*)中克隆表达,得到分子量分别为 49 kDa 和 51 kDa 的酶蛋白,对酶蛋白的分子量有了较为清晰的认知。2001 年,Shimizu 等[21]将多种微生物与内酯化物共培养,发现 DL-PL 水解活性广泛存在于各类微生物中,而细菌菌株倾向于水解混旋物的 L-对映体,真菌菌株优先水解 D-对映体。其中镰孢菌属、柱孢菌属和赤霉菌属对 D-PL 具有较高的水解活性。土壤杆菌属(*Agrobacterium*)大多具有 L-泛解酸内酯(L-PL)水解活性,测得 D-Lac 的相对分子量为 125 kDa,亚基分子量为 60 kDa[22]。2004 年,孙志浩等[10]经过对多个菌种的筛选,发现镰孢菌属、红曲霉属(*Monascus*)、粘帚曲霉属(*Gliocladium*)、青霉属(*Penicillium*)、根霉属(*Rhizopus*)和短梗霉属(*Aureobasidium*)等均具有 D-Lac 活性,而串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*) CGMCC0536 D-Lac 活性明显高于其他菌株。L-Lac 与

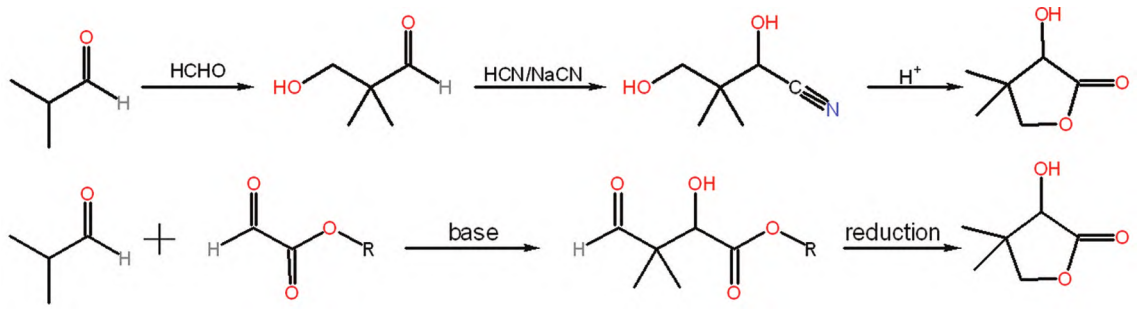


图 4 DL-泛解酸内酯化学合成路线[15]

Fig. 4 Chemical synthesis route of DL-pantolactone[15]

D-Lac 分别为选择性水解的不同构型。2000 年，Kataoka 等[22]发现来自根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 L-Lac 在 DL-PL 的水解中表现出高活性和高选择性。2002 年，Kesseler 等[23]利用根癌农杆菌 Lu678 的 L-Lac 对大肠埃希菌进行工程化改造，并超表达该水解酶，使酶活性提高了 200 倍，达 600 U/g。但是此路径需要 L-PL 完全水解才能获得高纯度的 D-PL，因此限制了工业上的生产应用。如果未来能够筛选出具有超高立体选择性的产 L-Lac 的菌株，将会给工业生产带来显著的经济效益。同时也可以通过减少 D-PA 内脂化为 D-PL 的步骤，并简化生产体系中的萃取过程来降低生产成本。

4 D-Lac 的酶学性质

4.1 D-Lac 的最适温度及其热稳定性研究

尽管已知生产 D-Lac 的菌株大多来自镰孢菌属，但各菌株的特性也不相同，所以发酵培养基的配置和优化与使用的产酶菌本身性质相关，因此不做比较。对于 D-Lac 酶学性质的研究，由于不同菌株产酶条件不同，或是反应条件的限制，国内学者给出的结果不尽相同。对于反应温度，D-Lac 的最适反应温度为 28 ~ 37 ℃，在一定温度范围内温度升高其水解速率增大，当温度升至 50 ℃后，酶水解速率急速下降。结果表明，DL-PL 水解速率随着温度的升高而增加，尤其在 35 ℃后增加明显，45 ℃时的水解速率是 30 ℃时的 3 倍[24]。而汤一新等[25]在研究 SW-902 产酶酶活性的最适条件时发现，50 ~ 55 ℃时其酶活性仍然很高，并且随着温度升高的时间延长，酶活性逐渐增强，55 ℃后酶活性迅速下降。虽然高温可以提高酶的水解速率，但会导致 D-PA 纯度下降。这主要是由于高温会使酶水解，进而降低其活性及产品纯度。此外，王开放等[26]还研究了水解酶的热稳定性，固定化酶经 50 ℃处理 30 min 后，酶活性依然保留最高酶活性的 75% 左右。

4.2 D-Lac 的最适 pH 及其 pH 稳定性研究

对 D-Lac 最适 pH 进行研究时发现，其具有特定的 pH 偏好，最适 pH 为 6.8 ~ 7.5[27-29]，进一步研究发现，pH 的变化会调整酶分子在反应体系中的空间结构，并且直接影响酶的催化功能[30]。同时，pH 会影响反应体系中不同组成成分的电离状态，包括底物分子、酶的活性位点中的催化基团以及反应生成的产物。这些组分电离形式的变化进一步调控它们之间的相互作用关系[31]。因此，pH 的波动可能降低底物与酶之间的结合能力，或干扰催化反应中的关键中间过程，从而导致整体酶促反应效率下降。

虽然已有研究表明 D-Lac 在 pH 值为 8 的条件下有更高的酶活性，但该 pH 值并不适用于实际工业生产。这主要是因为 D-Lac 对 pH 变化的耐受范围比较窄，在偏碱性条件下其结构稳定性容易受到破坏，从而导致酶活性快速降低。并且较高的 pH 还可能加快底物的非酶促水解反应，不仅加快底物消耗，还会降低最终产物的纯度[23]。因此，在实际生产过程中，为保证 D-Lac 催化活性的同时，减少 pH 对底物及产物的不良影响，通常将反应体系的 pH 值控制在 7 以下，以兼顾酶活性水平和产物质量。

4.3 底物浓度、酶浓度及金属离子对 D-Lac 酶活性的影响

研究发现，当底物浓度增大时，泛解酸的产率也随之提高。然而，在相同水解时间下，酶对底物的水解速率随底物浓度增加而降低。要达到一定水解率，高浓度底物则需要更长的水解时间，这会导致副产物增加，影响产品纯度。当底物浓度为 20% 时，D-Lac 的水解效率可以大于 20%[2]。

D-Lac 浓度试验结果显示，随着 D-Lac 浓度增加，产物中 D-泛解酸产量也随之增加，表明 D-Lac水解速率增加。但是，随着酶量的增加，酶的单体活力随之降低，且生产过程中所消耗的酶的成本相应提高。确定最佳酶系浓度为 5% ~ 10%[22]。

D-Lac 和底物浓度调控的成本与效率的矛盾需要权衡，高酶浓度虽可提升反应速率，但受限于生产成本与底物抑制效应；而底物浓度过高易导致副产物积累。为解决以上矛盾，可以结合米氏方程与反应动力学模型，建立动态浓度梯度优化策略，并开发固定化酶技术以提升酶的重复利用率。关于金属离子对 D-Lac 活性影响的相关研究较少，现有研究表明钙离子可活化自由酶及固定化酶，但锰、锌等离子对其活化效果不佳。另外，与游离酶相比，固定化酶对铜、镍、钴等离子具有较强的耐性[27]。

5 D-Lac 的固定化技术与工业应用

酶虽然高效环保[32],但是游离酶对外界环境很敏感,其在反复使用、极端温度或 pH 以及接触有机溶剂的情况下易失活,因此如何使酶在长时间保存过程中仍能保持较高的酶活性是一个重要的课题。20 世纪 60 年代,细胞内的固定化技术开始进入高速发展时期,该技术通过特定手段将目的蛋白质以特定的方式固定在不同的载体上得到固定化酶。将酶与载体复合,既可以提高酶的稳定性,增强反应的可控性,减少产物污染,还能增加底物与酶的接触,做到反复使用[33]。酶的固定方法主要有吸附、共价交联、包埋等方法[34]。

吸附法是利用离子间相互作用、范德华力和偶极场等相互作用实现对生物酶的固载。该方法采用大孔树脂、鸡蛋壳和凝胶等为载体,将固定化酶置于外支撑物上,此时酶的扩散限制会明显减弱。虽然该方法具有操作简便、成本低廉等优点[34],但仍存在固定化酶不稳定、容易泄漏等不足[35]。共价交联法利用载体上的化学基团与酶的亲核基团反应,从而实现酶与载体的牢固结合。常用的载体包括纤维素、琼脂糖、胶原蛋白和无机载体等,戊二醛是常用的交联剂,它能增强酶与载体之间的结合力,减少酶的脱落[36]。包埋法通过将酶或细胞嵌入可固化的载体中实现酶的固定化,这种方法可以采用不同的高分子凝胶形成格子型或微胶囊型结构,其中凝胶包埋法是最常用的方法之一[37]。

Tang 等[38]采用 K-卡拉胶包埋法,获得了高效的固定化 D-内酯水解酶,经 30 个周期共 24 h 连续反应,依然具有稳定的酶活性,平均水解率为 28.0%,4 ~ 8 ℃冷冻 8 周后,其酶活性基本不变。沈志强等[39]采用琼脂法,其固载率和循环再利用的时间和酶活性均稳定,力学性能好,循环使用 33 次后,固定化得率平均达 82.35%,酶活性基本保持在初始的 84.03%。谢颂洋[27]采用壳聚糖作为载体,酶在 pH 3.0、9.0 条件下,其酶活性可保持在 83.0%、50.9%,60 ℃时可保持酶活性的 50%,并可在反复使用后仍保持在 30% 左右。陈华等[40]利用海藻酸钠、氯化钙及普朗尼克 F-127 构建固定化载体,将产 D-PL 的细菌与固定化 D-PL结合,形成一种稳定的管状结构并与管道壁牢固结合,实现了对细胞的长期利用。陈鹏程等[41]将糖键合组件 D-Lac 的基因与酵母表达体系进行融合,获得粗酶液后与玻微晶维复合,得到固定化酶,经固定化酶处理,其酶活性在 30 d 后仍保持在 90%,循环利用 10 次后,酶活性仍保持在 60% 左右,具有较高的稳定性和可回收性。袁仪霄[42]采用一步法将 Dlac-CBM24 融合酶固定于甘蔗渣微晶纤维素,酶负载量达 4.23 mg/g,固定效率为 89.23%,优化后,固定化酶最适反应温度升至 40 ℃,稳定性显著增强,同时还开发了聚砜膜中空纤维反应器,重复使用 9 次后水解率保持在 28% 以上,4 ℃储存 180 d 酶活性仍保留 85% 以上,成功建立了高效稳定的 D-泛解酸生产体系。周思方[43]采用磁性纤维素固定化酶和水凝胶纤维管固定化细胞技术,使磁性纤维素固定化酶承载量达到 6 mL/g,水凝胶固定化细胞承载量达到 200 mg/mL,20 批次反应后保留 80% 酶活性,4 ℃储存 30 d 保留 96% 酶活性,显著提升了酶的稳定性和重复使用性。元佳丽等[44-45]利用氨基化细菌纤维素(BC-NH_2)固定 D-Lac,酶固载量达 372.5 mg/g,4.5 h 完成水解拆分,循环 10 次后仍保持较高酶活性。

虽然目前对于 D-Lac 固定化的研究较多,但仍缺乏一种被广泛认可并能够应用到实际生产中的固定化方案,各类固定化方法在实际工业应用中均存在一定不足,需要在实际操作中结合具体情况进行优化调整。近年来,磁性纤维素、氨基化细菌纤维素等新型载体材料的使用,不仅显著提升了酶的负载能力,还使酶的分离回收与重复使用更加便捷,在增强酶稳定性、降低生产成本方面也具有明显优势。未来通过优化固定化工艺参数、改进反应条件以及增强载体与酶的相互作用,为开发通用的 D-Lac 固定化方案提供可能性。

6 基于定向进化的 D-Lac 性能提升及表达体系优化

定向进化是指在试管中模拟达尔文进化过程,通过随机突变和重组,人为制造大量的突变,并按照特定的需要和目的给予选择压力,筛选出具有期望特征的蛋白质,实现分子水平的模拟进化[46]。这也是目前改善蛋白质性能最具前景的

方法。定向进化的发展拓宽了蛋白质工程的设计范围,可在未知目标蛋白质结构信息和作用机制的情况下对蛋白质进行改造。

柳志强[31]采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,对移除内含子的 D-Lac 的 cDNA 序列进行了克隆。通过软件预测,获得了一条新的来自链状镰孢菌属(*Trichoderma*)的 cDNA 序列,其编码序列与来自尖刀镰孢菌的 D-Lac 的 cDNA 序列有 90.06% 的相似性。采用 PCR 技术,将该酶的 cDNA 序列导入表达载体中,经 IPTG 诱导,再经 *tac* 启动子及乳糖操纵子的调节,实现其在 *E. coli*的高效表达。经测定,该菌株的酶活性为 37 ~41 U/g。进一步研究 D-Lac 的表达量,结果表明该酶在 40 kDa 左右具有较高的表达量,并利用生物信息学软件对该基因的分子量进行了预测。通过利用基因定点突变的方法对其进行改造,以增强其对酸性环境的耐性。以 *E. coli* 为研究对象,采用高效率的电化学转换方法,将突变重组质粒库转化到 *E. coli* 中,建立突变体库,在细胞内进行基因表达,得到了活性较强且在 pH 酸性条件下仍然保持高活力的酶系。实验结果表明,该进化酶活性比野生型提高 5.5 倍,而演化酶活性则为原酶活性的 75%,而在 pH 6.0 时,剩余酶活性为 50%[46]。沈治强[24]利用 ARTP 与 UV-LiCl 两种方法,通过 4 次逐步突变,获得 1 株酶活性明显增强的突变株,与出发菌株相比,其酶活性提高了 2.43 倍,为 3 460 U/L,8 次传代后,获得了较好的遗传稳定性,并提高了酶的催化活性,且不影响酶的催化性能。

江南大学的一项研究显示,将编码 D-Lac 基因插入表达载体 pPIC9K,构建重组表达载体并导入 GS115 中获得表达 D-Lac 的毕赤酵母(*Pichia pastoris*)工程菌 GS115,该工程菌在 3 L 发酵罐中高密度发酵,发酵产酶活性达到 1 145 U/mL[47],实现了 D-Lac 的高效表达,展现良好的工业应用前景。Zhang 等[48]报道了一种来自梭孢壳菌(*Thielavia* sp.) zmu20201 的新型对映选择性 D-Lac TSDL,并在 *E. coli* 中高效表达,表现出对 D-PL 的高对映选择性,优化条件下,TSDL 全细胞催化 200 g/L DL-PL,结果表明其转化率高且对映选择性良好,显示出工业化生产手性 D-PL 的潜力。Sun 等[49]通过计算设计优化 D-Lac,获得突变体 M3,催化效率较野生型提升 23 倍,全细胞转化 DL-PL 为D-PA,时空产率达 107.1 g/(L·h),展示了其在工业生产的应用潜力。同时,Sun 等[50]还比较了原核和真核宿主表达的 D-Lac,发现毕赤酵母表达的 PpLac-WT 在高底物浓度下抑制作用减弱,稳定性增强,突变体 PpLac-M1 转化率可达 40%,时空产率为 91.1 g/(L·h),揭示了 N-糖基化对酶构象和底物抑制的影响。

定向进化技术在酶工程领域具有广阔的应用前景,通过将理性设计与高通量筛选相结合,使 D-Lac 等工业用酶的性能得到显著提升。利用随机进化、改组设计、理性与半理性设计等分子生物学手段,不仅使酶活性得到极大的提升,还增强了其在高温、极端 pH 等恶劣环境条件下的结构稳定性,为生物酶的工业化应用奠定了坚实基础。虽然定向进化技术已经取得了很多成果,但仍存在有待优化的方向,例如在维持结构稳定性的同时突破酶活性的阈值仍需深入探索。此外,现有高通量筛选技术虽然在效率上已有明显提升,但在面对百万级突变体文库时,仍需投入大量时间和资源进行研究,因此,构建更高效、智能化的筛选平台已成为未来发展的重要方向。

7 酮类前体的不对称还原及其在 D-PL合成中的应用

通过 K-PL 不对称还原 D-PL 避免了使用剧毒的 HCN 或 NaCN,这种方法具有可持续发展的良好前景。Lanzilotta 等[51]发现,很多微生物可以将生长因素中的 K-PL 或 K-PA 还原为 D-PL 或 D-PA,这类微生物产生的酮类泛酸内酯还原酶(Ketopantolactone reductase, KPR)和酮类泛酸还原酶(Ketopantonic acid reductase, KAR)是合成 D-PL或 D-PA 的关键酶。Shimizu 等[6]鉴定了一批具有还原能力的微生物,包括霉菌、酵母菌、细菌、放线菌等。Shimizu 等[52-53]、Kataoka 等[54]首次报道了红假单胞菌(*Rhodopseudomonas*) IFO12540 细胞可以将其混旋型的 L-(+)同分异构体转变为具有外消旋的混旋型 D-(-)。首先,L-泛解酸内酯脱氢酶(L-Pantolactone Dehydrogenase, LPLDH)被催化生成 K-PL,K-PL 快速自发水解为 K-PA;然后将 K-PA 还原为 D-PA。反应完成

后,D-PA 通过酸处理进行内酯化。在上述转化过程中,最初存在于反应混合物中的 D-(－)异构体没有经过任何修饰,该反应最佳产率达到90.5%,对映体选择性为 94.4%,该还原体系简单,无需重结晶,具有实际生产意义。Si 等[55]报道了嗜麦芽链球菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)KPA 还原酶的 N 末端氨基酸,并对其进行测序,在此基础上,进一步将 KPA 还原酶的全长表达载体 pETSmKPR 转入 *E. coli*(DE3)中,以此为基础对其进行过量表达,并与葡萄糖脱氢酶(Glucose Dehydrogenase,GDH)进行耦合,该反应 K-PA 转化为 D-PA 的产率大于 88%,随后,又构建了共表达嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophi*)KPR 和 GDH 组分的重组 *E. coli*,这一过程与 *LPLDH* 在红球菌(*Rhodococcus*)中的过表达耦合,使 L-PL 在 168 h 内转化为 D-PA,转化率为 92%。万华化学有限公司[56]报道了一种高活性酮类泛解酸内酯还原酶突变体及其编码基因的应用,通过定向进化,成功获得了一株高酶活性的酮类泛解酸内酯还原酶突变菌株,该突变株在催化过程中表现出优异的酶活性和特性,为生物催化反应中提高酶活性提供了有效策略,为工业化生产提供支持。杭州鑫富科技有限公司与浙江工业大学的一项成果显示,构建了一个基于多酶重组细胞的级联催化体系,通过整合多个酶促反应模块并优化反应条件,成功实现了 D-PL 的高效制备[57],充分体现了多酶级联催化在提高反应效率和过程集成方面的优势,也为 D-PL 的绿色生物合成提供了新的技术思路。姚尧等[58]报道了一种以 α-酮基异戊酸和甲醛为底物合成酮泛解酸的全新合成策略,为该类化合物的生物合成提供了新的方法。

近年来,以 K-PL 为原料,使用共轭聚酮还原酶(Conjugated Polyketone Reductase,CPR)不对称还原为 D-PL 的研究取得了新进展。Zhao 等[59]在 *E. coli* 中构建了 CPR1 和 GDH 的共表达体系,催化 K-PL 不对称还原为 D-PL,并表达出较高的活性以及立体选择性,该方法实现了 NADPH 的有效再生,对映体过量(enantiomeric excess,e. e.)达 99.9%,产率达 91.6%。Wang 等[60]通过基因组挖掘方法从 GenBank 数据库中发现了一系列 CPRs,并克隆了来自假丝酵母菌(*Candida*)Co 90~125推定的 CPR 基因,在 *E. coli* BL21(DE3)中进行了表达,重组 CPR 的最适 pH 值和温度分别为 6.0~7.0 和 40 ℃,其产率和 e. e. 均为 99%。Cheng 等[61]表达了来自柏林念珠菌(*Candida dubliniensis*)CD36 的 CPR 基因,在以 K-PL 为底物的反应中表达了较高的催化活性和立体选择性,在连续进料反应中,K-PL(200 mmol/L)在 2 h 内的产率为 98%,e. e. 为 99%。由于辅酶和 NADPH 的高昂成本以及底物 K-PL 在纯水缓冲液中的稳定性差等因素,限制了该方法在生产中的应用。为了解决这些问题,Pei 等[62]开发了一种全细胞生物转化工艺,在两相反应系统中生产 D-PL。重组 CPR 和 GDH 在 *E. coli* 中共表达,同时实现D-PL的合成和 NADPH 的再生。由于双相反应体系中含有 15%(v/v)的二氯甲烷,显著抑制了 KPL 的不良水解。在补料-分批两相反应中,底物 KPL 在分批反应后连续送入反应器,D-PL浓度达到 0.77 mol/L,在混合物中反应 7 h,D-PL 的 e. e. 为 99%,时空产率 343.2 g/(L·d),可以用于工业化生产。

王加跑[63]利用 *E. coli* pACYCDuet-CorCPR-GDH 静息细胞催化 D-PL,优化条件为 pH 6.5、温度 35 ℃,连续流加工艺下产物浓度达 379 mmol/L,转化率 95%,e. e. 大于 99%,时空产率 157 g/(L·d)。Zhu 等[64]在 *E. coli* 中实现了来自光滑念珠菌(*Nakaseomyces glabratus*)的偶联聚酮还原酶的高效表达,纯化的 CPR 的最佳温度和 pH 值分别为 40 ℃和 4.5,为解决 K-PL 在合成 D-PL 的生物催化反应中的自发降解,该反应通过将全细胞催化剂补料分批添加与底物半连续补料相结合的策略进行反应。当 K-PL 上样量为 1 000 mmol/L 时,反应 13 h 后 D-PL 的分离产率为 94.24%,e. e. >99%,时空产率达到 228 g/(L·d)。Jin 等[65]开发了一种有效的三酶(拟甲醇无枝酸菌(*Amycolatopsis methanolica*)的 LPLDH、来自副接合酵母(*Zygosaccharomyces parabailii*)的 CPR 和来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 GDH 级联用于 DL-PL 的去外消旋化。LPLDH 催化 L-PL 脱氢生成酮基泛内酯,CPR 催化酮基泛内酯进一步生成 D-PL,GDH 与葡萄糖共同完成辅酶再生。在优化条件下,1.25 mol/L DL-PL 36 h 的去外消旋化率为 98.6%,时空产率为 107.7 g/(L·d)。Zhao 等[66]用半理性设计进行 CPR 的工程化以增

强酿酒酵母 KPR 催化活性,通过系统发育分析和分子动力学模拟,确定了 5 个可能的位点,并进行了半饱和、单点和组合位点突变,获得了几种酶活性提高的突变体,最终在优化条件下,突变体和 GDH 组成的全细胞体系可还原 490.21 mmol/L D-PL,e.e. 为 99%,转化率为 98%,时空产率为 382.80 g/(L·d)。Zhang 等[67]从哈萨克斯坦酵母(*Ketopantothenic*)中提取到新的 CPR,利用底物口袋改变策略,通过改变底物通道,调节口袋大小,促进质子转移,获得了突变体,其活性比野生型提高了 9.0 倍,k_{cat}/K_m 值提高了 2.6 倍。Zhu 等[68]采用一种新发现的来自 Hoagie 红球菌 LPLDH 对 L-PL 进行氧化脱氢,为减少 *E. coli* 中的膜结合型 LPLDH,采用分子伴侣辅助和降低诱导温度的策略实现 LPLDH 的可溶性表达,为提高其活性,通过定向进化和亲水性工程提高了酶的催化活性和热稳定性,最终使 1 mol/L DL-PL 的消旋化产率达到 91.2%。Sun 等[69]在毕赤酵母中表达了三种 D-型水解酶,其中 Fo-Lac 催化效率最高,4 h 的 DL-PL 水解率超过 40%,D-PA 浓度为 0.66 mol/L,时空产率达到 36.2 g/(L·h),展示出工业应用中的潜力。

不对称还原 K-PL 为 D-PL 是 D-PL 生产中的重要突破,但该方法还存在诸多问题,尚未应用到实际工业生产中。首先,辅酶因子 NADPH 成本高且再生效率低,很大程度上限制了生产规模,尽管通过共表达 GDH 已实现了辅因子的再生,但再生效率的速度与酶催化速度的差距依然过大。其次,K-PL 在水溶液中易自发水解会导致副反应增加,影响产物收率和纯度。虽然双相反应体系在一定程度上缓解了这一问题,但在其性质方面的研究不够透彻,缺乏有机溶剂对酶活性抑制作用的相关研究。另一方面,通过一系列的定向进化以及理性、半理性设计提高了 KPR 和 CPR 的催化效率和立体选择性,但酶的热稳定性和 pH 适应性没有得到显著提升,酶在高温或极端 pH 条件下容易失活。未来,结合分子动力学和计算生物学来阐明结构-功能关系,可以实现对酶进行精确修饰以提高其稳定性。多酶级联催化体系为高效合成 D-PL 提供了新方法,但多酶体系的协同效率和反应动力学匹配仍需进行优化。

8 展 望

D-PL 主要用于合成 D-泛酸及其衍生物,这些产物被广泛应用于医药、饲料以及食品添加剂等领域,具有广阔的市场前景。近年来,随着市场需求的增长,D-PL 下游产品的产能也在不断增加,例如我国的 D-泛酸钙产能在 2023 年已达到近 3 万 t,位居全球首位。随着科技的发展,传统的化学生产已不符合绿色生产理念,而不对称还原暂未实现工业应用,因此使用专一性水解酶仍是未来全球生产 D-PL 的重要途径。随着市场需求的进一步扩大,开发更高效、低成本且绿色环保的 D-PL 生产方法已成为目前亟需突破的关键问题。

虽然对 D-PL 的研究在持续推进,但主要成果却仅限于实验室,D-PL 用于大规模工业化量产仍存在一些问题。在实际生产中,D-PL 的生产对环境的要求较为苛刻,不利于大规模工业化生产,因此,未来研究可从以下两个方面进行。①挖掘极端环境下仍能高效生产 D-PL 的微生物是未来较有价值的研究点。目前的研究主要以陆地微生物为主,极地海洋资源宝库仍有待开发,发掘耐寒、耐高压高盐的微生物,从中筛选出具有更强适应性的菌株[70],有助于简化 D-PL 工业生产流程,降低生产成本。②构建 D-PA 人工复合群落。单一微生物往往只能完成特定的生产需求,对于生产链中的其他步骤,需要多种微生物协同作用,且每个生产步骤的要求及条件各有不同。例如在生产 D-PL 的过程中,需要额外进行人工萃取、消旋等步骤,再重新投料进行下一步生产,耗费了人力物力。构建复合群落,依靠多种酶的协同作用可更大程度地简化生产,减少有害试剂的使用,实现更高效的绿色生产。

极地海洋具有独特的环境,其低温、高盐、高压和强紫外线辐射等极端环境使得该区域的微生物进化出与之匹配的代谢途径和酶系统。这些微生物产生的低温酶相较于陆地微生物酶具有显著的特性,例如在低温下保持高催化活性,对热敏感,易在工业反应后快速失活以及具有较高的底物特异性等,在 D-PL 的工业化生产中具有显著优势,不仅可以降低反应体系能耗,还可以提高产物的光学纯度。

然而,从实验室研究到工业生产应用仍然面临诸多亟需解决的问题,例如运用 X 射线晶体学以及冷冻电镜技术探究其催化机制,阐明酶结构与功能的内在联系等。更重要的是,需要运用定向进化和理性设计等技术,提高酶在工业环境下的稳定性和催化效率。针对极地微生物培养困难等技术瓶颈,可以采取开发不同的异源表达系统、优化发酵工艺等策略尝试解决,这不仅为 D-PL 的绿色生产提供新的解决方案,而且建立的技术路线还可以扩展应用至其他手性化合物的合成,对推动整个生物制造领域的发展具有重要意义。

参考文献:

[1] Miallot R,Millet V,Galland F,et al. The vitamin B5/coenzyme A axis: A target for immunomodulation? [J]. European Journal of Immunology,2023,53(10): e2350435.

[2] 郑莉莉. D-泛解酸内酯水解酶产生菌的筛选及条件优化的研究[D]. 济南:山东轻工业学院,2009.

[3] Anastassakis K. Vit B5 (pantothenic acid)[M]. Androgenetic alopecia from A to Z: Vol. 2 Drugs, Herbs, Nutrition and Supplements. Cham: Springer International Publishing, 2022: 309-313.

[4] Kuo Z, Heng T, Bo Z, et al. Microbial production of vitamin B5: Current status and prospects[J]. Critical Reviews in Biotechnology,2022,43(8):1172-1192.

[5] Qin HB, Zhou JP, Niu K, et al. Balancing the (R)-pantoate and β-alanine pathway of *Escherichia coli* by modular co-culture engineering to produce D-pantothenic acid from glycerol[J]. Food Bioscience, 2025,64: 105964.

[6] Shimizu S,Hata H,Yamada H. Reduction of ketopantoyl lactone to D-(-)-pantoyl lactone by microorganisms[J]. Agricultural and Biological Chemistry,1984,48(9):2285-2291.

[7] Bachosz K, Zdarta J, Bilal M, et al. Enzymatic cofactor regeneration systems: A new perspective on efficiency assessment [J]. Science of The Total Environment, 2023, 868: 161630.

[8] Yamada H, Shimizu S, Hata H. Microbial oxidation of L-pantolactone or pantoate salts to keto analogs and concurrent conversion to D-iso-mers [P]. JP:61242586 , 1986

[9] Shimizu S, Hattori S, Hata H, et al. One-step microbial conversion of a racemic mixture of pantoyl lactone to optically active D-(-)-pantoyl lactone[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(3): 519-522.

[10] 孙志浩,华蕾. 生物技术法制备 D-泛酸钙和 D-泛醇[J]. 精细与专用化学品,2004(10):11-15.

[11] Sakamoto K, Yamada H, Shimizu S. D-pantolactone hydrolase and process for the preparation thereof[P]. U. S. Patent 5, 372,940. 1994-12-13.

[12] Sakamoto K, Yamada H, Shimizu S. Process for the preparation of D-pantolactone[P]. America:5275949. 1994-01-04.

[13] 王金金,郭振美,吕志果. 不对称催化合成手性泛解酸内酯的研究进展[J]. 工业催化,2014,22(5):335-340.

[14] 智研咨询. 2024-2030 年中国维生素 B5 行业市场研究分析及发展趋向研判报告[R]. 北京: 智研咨询, 2024.

[15] Du Z, Lv X, Liu N, et al. Asymmetric synthesis of pantolactone: Recent advances[J]. European Journal of Organic Chemistry,2023,26(46):2-8.

[16] Glaser E. Über die einwirkung von blausäure auf methyloldimethylacetaldehyd[J]. Monatshefte für Chemie und Verwandte Teile Anderer Wissenschaften, 1904, 25(1): 46-54.

[17] Stiller ET, Harris SA, Finkelstein J, et al. Pantothenic acid VIII. The total synthesis of pure pantothenic acid[J]. Journal of the American Chemical Society, 1940, 62(7): 1785-1790.

[18] Bourgeois F, Medlock JA, Bonrath W, et al. Catalyst repurposing sequential catalysis by harnessing regenerated prolinamide organocatalysts as transfer hydrogenation ligands[J]. Organic Letters, 2019, 22(1): 110-115.

[19] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K, et al. Lactonohydrolase catalyzed optical resolution of pantoyl lactone: Selection of a potent enzyme producer and optimization of culture and reaction conditions for practical resolution[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44: 333-338.

[20] Kobayashi M, Shinohara M, Sakoh C,et al. Lactone-ring-cleaving enzyme: Genetic analysis, novel RNA editing, and evolutionary implications[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(22): 12787-12792.

[21] Shimizu S, Kataoka M, Honda K, et al. Lactone-ring-cleaving enzymes of microorganisms: Their diversity and applications [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 92(2): 187-194.

[22] Kataoka M, Nomura JI, Shinohara M, et al. Purification and characterization of a novel lactonohydrolase from *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(6): 1255-1262.

[23] Kesseler M, Friedrich T, Höffken HW, et al. Development of a novel biocatalyst for the resolution of rac-pantolactone[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2002, 344(10): 1103-1110.

[24] 沈治强. D-泛解酸内酯水酶高产菌株的诱变筛选及其应用研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2022.

[25] 汤一新,孙志浩,华蕾,等. 微生物酶拆分方法生产 D-泛酸的手性中间体 D-泛解酸内酯[J]. 工业微生物,2001(3):1-5.

[26] 王开放,张梁,辛瑜,等. D-泛解酸内酯水解酶的固定化及酶学性质[J]. 生物加工过程,2019,17(2):159-165.

[27] 谢颂洋. D-泛解酸内酯水解酶的发酵工艺优化及固定化[D]. 无锡:江南大学,2021.

[28] 夏理山. D-泛解酸内酯的酶法制备工艺优化及酶基因的克隆表达的研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2021.

[29] 马佳鹏. 微生物酶法拆分 DL-泛解酸内酯[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009.
[30] 焦阳,汪建敏,吕凤霞,等. 固定化唾液链球菌的酶学性质研究[J]. 江西农业学报,2012,24(6):18-20,23.
[31] 柳志强. D-泛解酸内酯水解酶 cDNA 的克隆、表达与酶的定向进化[D]. 无锡:江南大学,2005.
[32] Buller R, Lutz S, Kazlauskas RJ, et al. From nature to industry: Harnessing enzymes for biocatalysis[J]. Science, 2023, 382(6673): eadh8615.
[33] Bolivar JM, Woodley JM, Fernandez-Lafuente R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization[J]. Chemical Society Reviews, 2022, 51(15): 6251-6290.
[34] Maghraby YR, El-Shabasy RM, Ibrahim AH, et al. Enzyme immobilization technologies and industrial applications[J]. ACS Omega, 2023, 8(6): 5184-5196.
[35] Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: A review[J]. Adsorption-Journal of the International Adsorption Society, 2014, 20(5-6): 801-821.
[36] Alavarse AC, Frachini ECG, da Silva RLCG, et al. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 202: 558-596.
[37] Yilun W, Guangze Y, Yang L, et al. Alginate-based materials for enzyme encapsulation[J]. Advances in Colloid and Interface Science,2023,318:102957.
[38] Tang YX, Sun ZH, Hua L, et al. Kinetic resolution of DL-pantolactone by immobilized *Fusarium moniliforme* SW-902[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(4):545-549.
[39] 沈治强,邢本,丁振东,等. 诱变选育 D-泛解酸内酯水解酶高产菌及发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业,2022,48(23):42-48.
[40] 陈华,周思方,常飞,等. 一种管状固定化 D-泛解酸内酯水解酶细胞的方法及其应用[P]. CN202310938705.7,2023-09-19
[41] 陈鹏程,袁仪霄,万昕玥,等. 一种一步纯化固定化 D-泛解酸内酯水解酶的方法及其应用[P]. CN202311795604.5,2024-03-22.
[42] 袁仪霄. D-泛解酸内酯水解酶的一步纯化固定化研究[D]. 无锡:江南大学,2024.
[43] 周思方. D-泛解酸内酯水解酶纤维素结合结构域的构建及其固定化[D]. 合肥:合肥大学,2024.
[44] 元佳丽,周晓悦,向忠润,等. 细菌纤维素固定化酶的制备及其水解拆分性能[J]. 安徽化工,2024,50(3):49-53.
[45] 元佳丽. 多糖基纳米纤维网络固定化 D-Lacs 酶的制备与性能研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2023.
[46] 柳志强,孙志浩,郑璞,等. D-泛解酸内酯水解酶的定向进化[J]. 生物工程学报,2005(5):773-781.
[47] 江南大学. 一种毕赤酵母基因工程菌及其制备 D-泛解酸内酯水解酶的方法:202011587026.2[P]. 2021-03-26.
[48] Zhang QH, Fang Y, Luo WF, et al. Biocatalytic kinetic resolution of d, l-pantolactone by using a novel recombinant d-lactonase[J]. RSC Advances, 2021, 11(2): 721-725.
[49] Sun R, Zheng P, Chen P, et al. Enhancing the catalytic efficiency of D-lactonohydrolase through the aynergy of tunnel engineering, evolutionary analysis, and force-field calculations.[J]. Chemistry-A European Journal, 2024, 30(16): e202304164.
[50] Sun R, Yan Q, Deng W, et al. N-glycosylation-modifications-driven conformational dynamics attenuate substrate inhibition of d-lactonohydrolase[J]. Bioorganic Chemistry, 2025, 155: 108122.
[51] Lanzilotta RP, Bradley DG, McDonald KM. Microbial reduction of ketopantoyl lactone to pantoyl lactone[J]. Applied Microbiology, 1974,27(1):130-134.
[52] Shimizu S, Yamada H, Hata H, et al. Novel chemoenzymatic synthesis of d(−)-pantoyl lactone[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(1): 289-290.
[53] Shimizu S, Hattori S, Hata H, et al. One-step microbial conversion of a racemic mixture of pantoyl lactone to optically active D-(−)-pantoyl lactone[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(3): 519-522.
[54] Kataoka M, Shimizu K, Sakamoto K, et al. Optical resolution of racemic pantolactone with a novel fungal enzyme, lactonohydrolase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(6): 974-977.
[55] Si D, Urano N, Shimizu S, et al. Cloning and overexpression of ketopantoic acid reductase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* and its application to stereospecific production of D-pantoic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93: 1619-1625.
[56] 万华化学(四川)有限公司,万华化学集团股份有限公司. 一种高活性酮基泛解酸内酯还原酶突变体及其编码基因和应用:202210519820.6[P]. 2025-02-18.
[57] 杭州鑫富科技有限公司,浙江工业大学. 多酶重组细胞及多酶级联催化合成 D-泛解酸内酯的方法:201910366856.3[P]. 2021-06-22.
[58] 姚尧,卢希阳,舒琳,等. 以葡萄糖为原料结合生物发酵与化学合成制备酮泛解酸[J]. 过程工程学报, 2022, 22(1): 11.
[59] Zhao M, Gao L, Zhang L, et al. Asymmetric reduction of ketopantolactone using a strictly (R)-stereoselective carbonyl reductase through efficient NADPH regeneration and the substrate constant-feeding strategy[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(11): 1741-1746.
[60] Wang J, Cheng P, Wu Y, et al. Discovery of a new NADPH-dependent aldo-keto reductase from *Candida orthopsilosis* catalyzing the stereospecific synthesis of (R)-pantolactone by genome mining[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 291: 26-34.

[61] Cheng P, Wang J, Wu Y, et al. Recombinant expression and molecular insights into the catalytic mechanism of an NADPH-dependent conjugated polyketone reductase for the asymmetric synthesis of (R)-pantolactone[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 126: 77-85.

[62] Pei X, Wang J, Zheng H, et al. Highly efficient asymmetric reduction of ketopantolactone to d-(-)-pantolactone by *Escherichia coli* cells expressing recombinant conjugated polyketone reductase and glucose dehydrogenase in a fed-batch biphasic reaction system[J]. Reaction Chemistry & Engineering, 2020, 5(3): 531-538.

[63] 王加跑. 共轭聚酮还原酶基因挖掘和催化 D-(-)-泛酰内酯的不对称合成[D]. 杭州:杭州师范大学,2019.

[64] Zhu FY, Zhang J, Shen Q, et al. Development of an *Escherichia coli* whole cell catalyst harboring conjugated polyketone reductase from *Candida glabrata* for synthesis of d-(-)-pantolactone[J]. Process Biochemistry,2022, 112: 223-233.

[65] Jin L, Liu X, Wang T, et al. Multi-enzymatic cascade for efficient deracemization of dl-pantolactone into d-pantolactone[J]. Molecules, 2023, 28(14): 5308.

[66] Zhao M, Zhou B, Jia X. et al. Increasing catalytic efficiency of SceCPR by semi-rational engineering to wars the asymmetric reduction of D-pantolactone[J]. Journal of Biotechnology, 2023, 373: 34-41.

[67] Zhang XJ, Cao M, Luo YF, et al. Efficient synthesis of D-pantolactone in monophase and organic-aqueous biphase reaction biosystem using a novel conjugated polyketide reductase based on integrated substrate pocket alteration[J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 200: 109088.

[68] Zhu FY, Yang Q, Cao M, et al. Tuning an efficient *Escherichia coli* whole-cell catalyst expressing l-pantolactone dehydrogenase for the biosynthesis of d-(-)-pantolactone[J]. Journal of Biotechnology, 2023, 367: 1-10.

[69] Sun R, Zheng P, Wu D, et al. Biocatalysis of heterogenously-expressed d-lactonohydrolases and its efficient preparation of desirable d-pantoic acid[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 155: 109981.

[70] Shu WS, Huang LN. Microbial diversity in extreme environments[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(4): 219-235.