

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-070

酶催化在维生素及其衍生物制备中的应用

王盼盼¹, 于洪巍²

(¹ 浙江新和成股份有限公司, 浙江 绍兴 312500; ² 浙江大学化学工程与生物工程学院生物工程研究所, 浙江 杭州 310027)

摘要: 酶是一种天然的催化剂, 与化学催化剂相比, 酶往往具有独特而卓越的催化性能。对酶的挖掘、改造和应用一直是生物工程重要研究方向。随着酶的挖掘和改造技术不断发展进步, 酶催化技术在工业上的应用范围也越来越广。在维生素工业生产中, 维生素C和维生素B₁₂早已实现发酵法生产, 而维生素B₂在21世纪初也由化学合成转向发酵法生产。除上述维生素外, 其他维生素均主要采用化学路线合成。而在维生素的化学合成路径中, 酶催化替代化学催化的案例越来越多, 比如维生素B₃、维生素B₅和维生素D₃的合成, 以及维生素酯类和糖苷类衍生物的合成。所涉及的酶种类包括酯水解酶、天冬氨酸酶、P450酶和脂肪酶等。本文对酶的筛选和改造方法做了总结, 综述了酶催化技术在维生素及其衍生物合成中的应用。随着对酶催化机制的深入理解, 化学工程、计算机辅助设计等多学科交叉融合, 酶催化技术将在维生素及其他天然产物的合成方面发挥其独特优势。

关键词: 酶; 酶催化; 维生素; 维生素衍生物; 脂肪酶

中图分类号: Q814.9 **文献标志码:** A

Application of enzyme catalysis in the preparation of vitamins and their derivatives

WANG Panpan¹, YU Hongwei²

(¹Zhejiang NHU Company Ltd., Shaoxing 312500, Zhejiang, China; ²Institute of Bioengineering, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China)

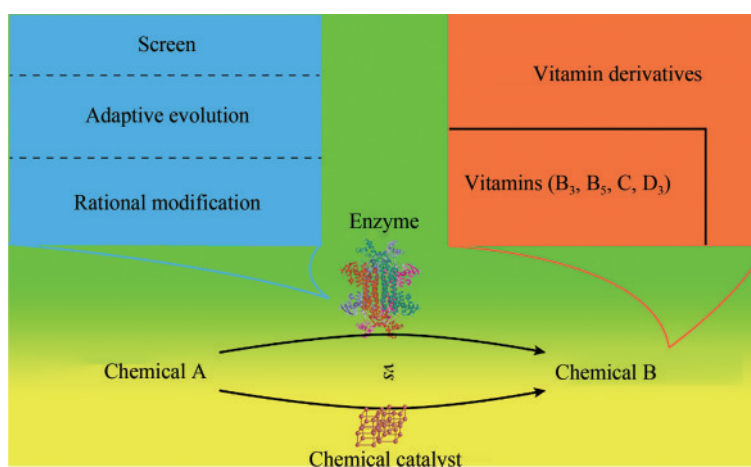
Abstract: Enzymes, as a kind of natural catalysts, often have unique and excellent catalytic performance compared with chemical catalysts. The mining, modification and application of enzymes have always been a key research field of bioengineering. With the development of enzymes mining and modification technology, enzymatic catalysis has been widely used in industry. In the production of vitamins, vitamin C and vitamin B₁₂ have been produced by fermentation with a long history, and vitamin B₂ has also been produced by fermentation instead of chemical synthesis since the beginning of this century. In addition to the above vitamins, other vitamins are mainly synthesized by chemical routes. In the chemical process of vitamin synthesis, more and more cases of enzymatic catalysis to replace chemical catalysis

收稿日期: 2021-07-02 修回日期: 2021-11-10

引用本文: 王盼盼, 于洪巍. 酶催化在维生素及其衍生物制备中的应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(3): 500-515

Citation: WANG Panpan, YU Hongwei. Application of enzyme catalysis in the preparation of vitamins and their derivatives[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(3): 500-515

have been explored for semi-chemo-based production. For examples: Biological enzymatic resolution instead of chemical chiral resolution in vitamin B₅ synthesis; Nitrile hydration catalyzed by nitrile hydratase instead of chemical catalyst in the synthesis of vitamin B₃; The synthesis of active vitamin D₃ [such as 25(OH) vitamin D₃] by P450 enzyme. Furthermore, many vitamin esters or glycoside derivatives are synthesized by lipases or glycosyltransferases. In this article, industrial applications of enzymes in this regard are reviewed, including screening, directed evolution and rational modification of the enzymes. Moreover, the applications of enzymatic catalysis in the synthesis of vitamins are summarized, including vitamin B₃, vitamin B₅ and vitamin D₃. The production of vitamin C is also highlighted because its fermentation process is similar to enzymatic catalysis. We also summarize the synthesis of several vitamin derivatives, mainly including ester derivatives of vitamin A, vitamin C and vitamin E, which are synthesized by lipases, and glycoside derivatives of vitamin C, which are synthesized by glycosyltransferases. Finally, we compare the advantages and disadvantages of chemical synthesis, fermentation and enzymatic catalysis in the production of vitamins. The characteristics and application potential of enzymatic catalysis are summarized. With the in-depth understanding of enzymatic catalysis mechanism, enzymes will play their unique advantages in the synthesis of vitamins and other natural products through integration of chemical engineering, computer aided design and other interdisciplinary knowledges.



Keywords: enzymes; enzymatic catalytic; vitamins; vitamin derivatives; lipases

天然酶绝大部分是具有催化功能的蛋白质，也有少部分是RNA，而生物工程领域研究的酶大多都是蛋白质。自然界中存在功能繁多的酶，而且生命体中大部分反应都是酶催化反应。通常，酶对底物具有良好的专一性，催化反应高效，具有空间选择性。而在非天然环境下，酶往往具有多功能性，比如底物多样性、催化反应多样性和催化环境多样性，这为酶的应用提供了更多的可能。酶催化是利用天然或人工改造的酶（或含酶细胞）催化目标底物合成所需产品的技术。本文主要介绍酶的筛选及改造技术，并总结了维生素

及其衍生物合成过程中酶催化技术的应用情况。

1 酶的筛选和改造

1.1 天然酶的筛选

1.1.1 传统筛选

天然存在的酶种类繁多，大多不被人们熟知。我们可以通过采集天然样品，如土壤、海水等，通过直接培养或分子生物学手段获得特定功能的酶（或菌种）。比如利用透明圈（淀粉或脱脂奶

粉)法筛选高产淀粉酶或蛋白酶的微生物^[1-2];利用刚果红染色法从富含纤维素的土壤中筛选可降解纤维素的微生物,得到高产纤维素酶的菌种^[3-4];或利用含铜富集培养基从土壤中筛选具有良好漆酶活性的芽孢杆菌应用于染料废水脱色^[5-6]。此类传统方法限制条件较少但筛选效率低,所获得的酶催化效率大多无法达到工业生产要求。然而,传统筛选仍然是现代生物工程不可或缺的技术手段,一是自然界中包含太多未知的微生物或酶,可能获得稀有功能的酶,比如能降解有机磷农药的有机磷水解酶^[7],能催化碳氢键活化的过氧化酶^[8]等。二是极端微生物的存在使得筛选出具有良好耐受能力的酶成为可能,比如耐热、耐盐或耐极端pH的酶等^[9-10]。

随着基因测序和合成技术日趋成熟,生物信息学数据库所包含的基因和基因组数据已十分丰富,常用的数据库包括NCBI、KEGG、PDB、UniProt等。通过基因序列比对及生物信息学挖掘,可直接从数据库中分析得到相关功能的酶基因^[11-12]。将这些基因导入特定的宿主实现酶蛋白表达,可获得表达特定酶的菌株。从已有数据库中直接筛选目标酶的优势在于:利用数据库资源和生物信息学工具可对目标酶进行预测和分析,减轻了传统天然筛选的烦琐工作;不用考虑微生物的可培养性问题,十分适用于不可培养微生物中酶基因的挖掘^[13]。然而,相对于天然微生物资源,数据库资源仍然有限,且大多数基因功能未知。因此,将传统天然筛选及生物信息学数据分析两种方式结合才是酶筛选的最有效方式^[14]。

1.1.2 高通量筛选

为了提高酶的筛选效率,可在酶活表征反应的基础上,建立以特征反应为基础的筛选方法。通过结合高通量筛选设备,如QPix菌落挑选设备、微流控设备^[15]、流式细胞仪^[16]、高通量摇床等,实现筛选过程的半自动化甚至自动化,建立起酶的高通量筛选方法。高通量筛选样本可以由天然样品中获得,如土壤、海水等,也可以是通过诱变得到的突变体酶库,或者是通过随机突变或基因重排等分子生物学手段构建的人工突变体库。常见高通量筛选方法包括基于荧光或荧光共振能量转移显色反应,通过检测荧光强度挑选出高活

力的产酶菌株^[17-18],或是基于酸碱指示剂或其他化学显色反应,通过检测颜色变化筛选高酶活菌株^[19]。

1.2 酶的定向进化

自然界中天然存在的酶在催化活性、稳定性或其他反应特性方面往往无法满足工业化需求。为了优化天然酶的催化特性,我们需要对酶本身进行非理性改造或理性改造。定向进化(the directed evolution)是非理性改造最常用的技术。定向进化的概念和技术由France H. Arnold教授于1993年提出。定向进化的本质是模拟自然生物的突变和选择,通过人为构建酶基因突变库,并建立有效的筛选方法,积累正向突变,得到目标突变体酶^[20]。France H. Arnold教授等^[21]通过连续反复地对枯草杆菌蛋白酶E(Subtilisin E)编码基因进行随机突变,并经逐步积累正向突变,最终获得可在高浓度有机溶剂二甲基甲酰胺(DMF)中稳定存在且表现出活性的突变体。随着高通量筛选技术的发展,定向进化可以和高通量筛选技术相结合,通过大规模建库(酶的突变体库),结合高通量筛选技术,可快速获得正向突变株^[22]。

1.3 酶的理性改造

酶的理性改造主要是以酶分子结构为基础,通过分析酶功能单元和酶催化机制,采取定点突变或饱和突变的方式改造酶,获得催化性能优良的酶突变体。只有对酶的结构和功能有较为深入的理解才能设计出性能更加优良的新酶^[23]。随着对自然界天然酶的结构研究工作的不断开展,酶结构数据库越来越丰富,但还有大部分酶的晶体结构没有被解析,难以满足理性改造的需要。另一方面,生物信息学和计算机辅助设计也不断发展,人们可以通过序列比对、同源建模及分子动力学模拟等,分析酶的保守区和活性中心,也可以进行分子对接分析酶和底物的可能的结合方式和状态,通过这些信息对酶进行重新设计改造,大大加速了酶理性改造进程^[24-25]。

2 酶催化合成维生素或其中间体

目前,除维生素B₂和维生素B₁₂采用发酵法合成,其他维生素都是采用化学法或者化学法耦合酶法合成。其中,维生素B₃化学合成路线的最后一步是采用腈水合酶催化烟腈生成烟酰胺,这是工业上腈水合酶的主要应用之一。维生素B₃化学合成过程中涉及D/L-泛解酸内酯的光学拆分步骤,工业上一般是通过筛选酯水解酶(或者可产酯水解酶的菌株)进行手性选择性催化从而实现拆分。另外,近几年,维生素B₃的另一个重要前体β-丙氨酸也成功实现了酶催化工业化生产,与化学法相比具有明显的成本优势。维生素C两步发酵法已工业化近50年,随着对生物合成相关酶的研究愈发深入,发现发酵机制与酶催化十分接近,这些发现将推动维生素C发酵法的二次革新。维生素D₃一般采用化学法合成,然而活性维生素D₃(羟基化维生素D₃)的化学合成非常复杂,大规模产业化困难。采用羟基化酶进行维生素D₃羟基化合成已展示出潜力,有望在较短的时间实现工业化并替代化学法。与化学法相比,酶法一般具有反应条件温和、步骤简便、选择性高等特点,有时甚至能够催化化学法难以进行的反应。目前酶法的工业应用包括氧化还原、水解、酯化等反应,酶的应用形式也多种多样,如固定化或游离酶、固定化或游离细胞等,且应用范围正不断扩展^[26-27]。下面将介绍酶催化技术在上述几种维生素合成过程中的应用情况。

2.1 维生素B₃

维生素B₃又称为烟酸,烟酸在体内将会代谢生成烟酰胺,即尼克酰胺。目前市场上产品以烟酰胺为主。烟酰胺全球产能超过10万吨/年,主要生产企业为瑞士龙沙、美国凡特鲁斯、印度吉友

联等。由于3-甲基吡啶或3-氰基吡啶原料制约,国内企业长期未实现大规模生产烟酰胺。烟酰胺在蛋白质和糖的新陈代谢中起重要作用,被广泛应用于饲料(67%)、医药化妆品(20%)和食品(13%)领域。烟酰胺通常以3-甲基吡啶为原料通过氨氧化法合成,但该化学法收率低且有副产物烟酸。目前工业上采用化学法耦合酶催化法的方式合成烟酰胺,具体是以3-甲基吡啶为原料,通过化学催化合成3-氰基吡啶,3-氰基吡啶再经过腈水合酶催化生成烟酰胺(图1)。

1980年,日本京都大学Asano等^[28]发现微生物*Rhodococcus rhodochrous* J1可催化腈类化合物水合生成酰胺,并将起作用的酶命名为腈水合酶。不久之后,腈水合酶即应用于工业生产丙烯酰胺^[29]。腈水合酶来源主要为细菌,如红球菌属、诺卡氏菌属、假单胞菌属、节杆菌属、拟无枝酸菌属等。腈水合酶根据金属离子依赖性不同,可分为三类,一是非血红素铁离子依赖型,如*Rhodococcus erythropolis* A4^[30]、*Pseudomonas chlororaphis* B23^[31]来源的腈水合酶;二是非类咕啉钴离子依赖型,如*Rhodococcus. rhodochrous* J1^[32]来源的腈水合酶;三是其他金属离子依赖型的腈水合酶,这类腈水合酶目前发现较少,如锌离子或铜离子依赖型^[33]。除了丙烯酰胺以外,腈水合酶工业化应用最广的是烟酰胺的生产,早在1988年,日本研究者利用*Rhodococcus. rhodochrous* J1全细胞作为催化剂,实现催化3-氰基吡啶生产烟酰胺,催化收率达100%,没有烟酸或其他副产物生成^[34]。

2.2 维生素B₅

维生素B₅,又称D-泛酸或遍多酸,商品形式主要为D-泛酸钙。维生素B₅在生物体内广泛存在,主要用于合成辅酶A,并参与糖类、脂肪及蛋白质代谢。全球维生素B₅产能约2.8万吨,国内产能占

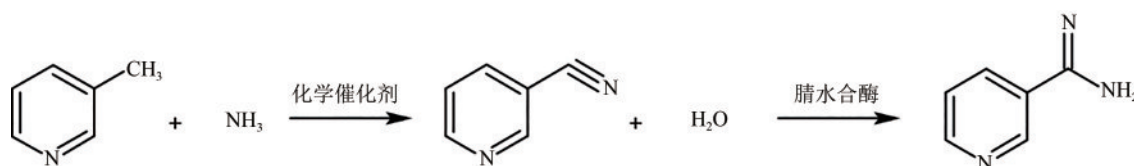


图1 烟酰胺的合成步骤

Fig. 1 Process for nicotinamide synthesis

全球约80%份额，主要生产企业包括亿帆医药、新发药业、兄弟科技等。维生素B₅是人和动物生长发育不可缺少的营养元素，主要应用于动物饲料、食品添加剂及医药原料药，其中动物饲料应用占比达75%。

维生素B₅主要采用化学法合成，合成过程涉及DL-泛内酯的手性拆分。通过化学法手性拆分DL-泛内酯需采用手性拆分剂，如手性氨、喹啉化合物或二甲马钱子碱等，这些拆分剂价格昂贵、有毒且分离困难^[35]。19世纪70年代，生物科学家发明了多种类型的酶催化拆分DL-泛内酯或DL-泛解酸的方法。主要包括：①选择性水解L-泛解酸内酯，回收未被水解的D-泛解酸内酯用于下游维生素B₅的合成。水解产物L-泛解酸也可以回收，通过消旋及内酯化反应重新用于水解拆分。②选择性水解D-泛解酸内酯，回收生成的D-泛解酸，重新酯化得到高纯D-泛解酸内酯。第1种方法L-泛解酸内酯水解酶活性不高，水解不完全将导致回收的D-泛解酸内酯不纯，而第2种方法不要求水解彻底，回收的D-泛解酸内酯纯度高，目前工业上广泛应用第2种方法实现DL-泛解酸内酯拆分^[36]。

D-泛解酸内酯水解酶在丝状真菌中存在较为广泛，如镰刀菌属 (*Fusarium* sp.)、赤霉菌属 (*Gibberella* sp.)、黏帚霉属 (*Gliocladium* sp.)、黑曲霉属 (*Aspergillus* sp.)、青霉属 (*Penicillium* sp.)、根霉菌属 (*Rhizopus* sp.)、短梗霉属 (*Aureobasidium* sp.) 等^[37]。传统筛选利用溴百里酚蓝等酸碱指示剂，可从土壤中筛选出具有D-泛解酸内酯水解酶活性的菌株。再通过化学试剂、紫外或常压室温等离子体 (atmospheric room temperature plasma, ARTP) 诱变，可筛选得到高D-泛解酸内酯水解酶活性的菌株。1998年，日本第一制药首次将酶催化拆分DL-泛解酸内酯应用于工业化^[38]。2001年，江南大学孙志浩团队^[39]也成功筛选出具有高效水解D-泛解酸内酯活性的串珠镰孢霉菌，并在浙江鑫富药业股份有限公司得到工业化应用。

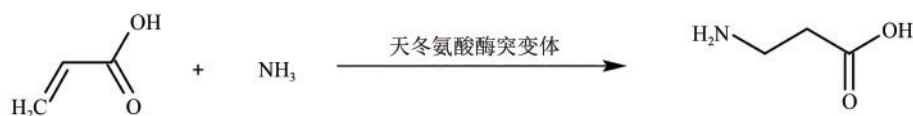
维生素B₅合成反应的最后一步是通过D-泛解酸内酯和 β -丙氨酸(钙)进行缩合反应生成D-泛解酸(钙)。 β -丙氨酸是维生素B₅的直接前体，是目前已知唯一天然存在的 β -氨基酸。 β -丙氨酸虽然

不参与蛋白质合成，但在生物体内是肌肽、鹅肌肽等肌源活性肽，以及辅酶A合成的重要前体。 β -丙氨酸作为增强肌肉耐力的运动营养补充剂已经广泛应用于临床营养领域。另外， β -丙氨酸可提高动物生产性能，调控肌肉生长和肌源活性肽含量，改善肉品质量，被广泛应用于饲料添加剂领域。

β -丙氨酸合成路线可分为3种方式，共包括6种合成路线，分别是2种化学合成法、3种酶催化法和1种发酵法路线。目前化学合成法和酶催化法均在工业化生产上得到广泛应用。丙烯腈化学合成路线工艺最成熟，但缺点明显，比如有废盐产生，酸碱用量大等^[40]。丙烯酸化学合成路线工艺相对丙烯腈路线更简洁，无废盐产生，相对更优^[41]。发酵法主要是通过改造大肠杆菌合成 β -丙氨酸，由于成本问题目前还没有实现工业化^[42-43]。

酶催化合成 β -丙氨酸现有路线包括3条，分别以富马酸、天冬氨酸和丙烯酸为底物，通过酶催化合成 β -丙氨酸。在生物体内， β -丙氨酸合成途径的最后两步即是由天冬氨酸酶催化富马酸合成天冬氨酸，再由天冬氨酸- α -脱羧酶催化天冬氨酸合成 β -丙氨酸。因此，以酶催化生产 β -丙氨酸最直接的方式就是利用富马酸或者天冬氨酸为底物合成 β -丙氨酸^[44]。比较两种酶法，富马酸路线的问题是需两种酶催化，催化收率难以保证，而天冬氨酸路线原料成本高。另外，两种酶催化路线有天然缺陷需要克服：①都需要天冬氨酸- α -脱羧酶，该酶活性水平低，需要进行改造；②天冬氨酸- α -脱羧酶催化脱羧反应，整个过程将损失1分子CO₂，原子经济性差；③和丙烯酸相比，富马酸和天冬氨酸原料成本相对较高。

2017年中科院吴边团队通过计算机分子模拟，发现了能够高效催化丙烯酸合成 β -丙氨酸的天冬氨酸酶突变体^[45]；因此发明了以丙烯酸为底物的酶催化法生产 β -丙氨酸，并实现工业化应用(图2)^[46-47]。与富马酸或天冬氨酸为底物的酶法相比，丙烯酸酶催化法的优势明显，比如原料便宜，一步酶催化理论收率高。该方法通过对天冬氨酸酶改造，成功拓宽了酶本身底物谱，使突变体酶催化本身完全不能催化的新底物，缩短了天然酶促反应合成步骤，成功代替了化学法。

图2 酶催化合成 β -丙氨酸Fig. 2 Synthesis of β -alanine through the enzymatic catalysis

2.3 维生素C

维生素C，即L-抗坏血酸，是人必需的维生素。维生素C具有很强的抗氧化能力，因其可治疗坏血病而广为人知。维生素C被广泛应用于食品添加剂、动物饲料和医药化妆品领域，其中食品添加剂应用占比达70%。20世纪70年代以前，维生素C的合成一直采用罗氏化学法，合成路线复杂且收率低。1973年，中科院联合沈阳药科大学通过传统筛选的方法发现能将L-山梨糖转化为2-酮基-L-古龙酸（2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG）的微生物^[48]。此后，中国科学家通过诱变等手段不断优化菌株，最终开创了两步发酵法产维生素C。目前，我国维生素C产能已达20万吨/年，占全球90%以上，主要生产企业包括石药集团、鲁维制药、帝斯曼江山、东北制药等。

两步发酵法第1步是利用氧化葡萄糖酸杆菌将D-山梨醇催化生成L-山梨糖，具体起催化作用的是D-山梨醇脱氢酶，辅酶为吡咯喹啉醌（pyrroloquinoline quinone, PQQ）；第2步是利用普通生酮基古龙酸菌和巨大芽孢杆菌（或其他芽孢杆菌）混菌发酵L-山梨糖生成2-KLG，具体起催化作用的是普通生酮基古龙酸菌中的L-山梨糖/山梨酮脱氢酶，辅酶也是PQQ^[49]。最终，发酵得到的2-KLG可通过酯化及内酯化反应合成维生素C。

2-KLG的发酵法实际上仅有2种（或3种）酶促反应^[50]。但工业上一直采用两步发酵而不是催化反应合成维生素C，原因总结如下：①该两步发酵所涉及的酶都是PQQ依赖的脱氢酶，PQQ是除黄素类和腺苷类辅酶以外的第3类辅酶，能合成PQQ的微生物相对较少，导致外源活性表达2-KLG合成相关脱氢酶较困难^[51-52]；②PQQ的合成（氧化还原循环）和细胞呼吸链耦合，采用酶催化（或全细胞催化）可能导致辅酶供给不足，降低催化效率^[53-54]；③D-山梨醇或L-山梨糖转化的同时提供细胞生长所需能量，D-山梨醇或L-山梨糖既

作催化底物也作为发酵碳源，采用发酵法对原料利用更有效率，因而比酶催化更有优势。2-KLG的发酵法生产要想进一步革新，最有潜力的研究方向是将2-KLG的两步发酵合为一步^[55]。这需要深入理解上述酶催化反应机制，将酶促反应通过基因工程手段整合到单个菌株中，或者通过混菌发酵山梨醇生产2-KLG。目前，江南大学周景文团队^[56]已实现一步发酵合成2-KLG，产量达72.4 g/L。

2.4 维生素D₃

维生素D₃，即胆钙化醇，是维生素D的一种，可由7-脱氢胆固醇经紫外线照射生成。维生素D₃可治疗甲状腺机能衰退、骨质疏松症和慢性肾衰竭等疾病。全球维生素D₃产能约1万吨/年，我国产能约占全球产能75%。维生素D₃生产企业包括浙江花园生物、荷兰帝斯曼、浙江新和成等。

维生素D₃本身没有生物活性，而是在体内（主要是肝脏和肾脏）经羟化反应生成活性维生素D₃并发挥其生理作用。活性维生素D₃包括3种类似物，1 α (OH)VD₃、25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)VD₃^[57]。活性维生素D₃可通过化学合成法和酶催化法合成。化学法合成途径复杂，需要多步的基团保护和脱保护，涉及光照、开环和异构化反应等合成步骤，污染严重，大规模生产十分困难。而酶法具有催化位点特异性，P450羟化酶能特异性催化维生素D₃相应位点羟基化。因此，挖掘并改造P450羟化酶实现维生素D₃高效羟基化反应是实现活性维生素D₃大规模产业化的关键。

酶催化法通常采用哺乳动物或微生物来源的P450羟化酶催化维生素D₃羟基化合成活性维生素D₃（图3）。自Horsting和Deluca^[58]于1969年发现小鼠肝脏匀浆可催化维生素D₃的C-25位羟基化后，越来越多的羟化酶被发现。1991年，Sasaki等^[59-60]先后从链霉菌属和无枝酸菌属中筛到多株可转化维D₃合成25(OH)VD₃或1 α ,25(OH)VD₃的

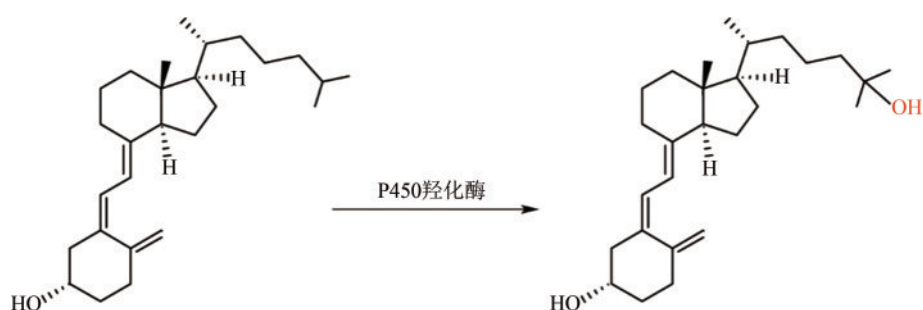


图3 P450羟化酶催化维生素D₃合成25-羟基维生素D₃

Fig. 3 Synthesis of 25 (OH)VD₃ from vitamin D₃ under the catalysis of P450 hydroxylase

菌株。其中，自养无枝酸菌 FEM BP-1573 具有最高的活性。在 200 L 发酵罐中，自养无枝酸菌 FEM BP-1573 能够催化合成 25(OH)VD₃ 和 1 α , 25(OH)VD₃，产量分别达到 8.3 mg/L 和 0.17 mg/L。2009 年，Fujii 等^[61] 也是从一株自养无枝酸菌 [又名自养假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia autotrophica* NBRC 12743)] 分离出 P450 单加氧酶 CYP107 (Vdh)，发现该酶能够对维 D₃ 进行 1 位与 25 位羟化。其团队对该酶进行了异源表达与定向进化，得到了比野生酶活性高约 20 倍的突变体酶 Vdh-K1，该突变体酶具有一定的工业化潜力。

3 酶催化合成维生素衍生物

大多数维生素都是天然的抗氧化剂，易被氧化，存储困难且不利于后续加工。另外，维生素因为溶解特性不同，工业应用范围受限。为此，工业上常常将维生素制备成各种衍生物，在保留维生素本身生物活性的同时，提高其稳定性、溶解性或其他特性。维生素衍生物中，最常见的是酯类衍生物和糖苷类衍生物。在早期研究中，上述衍生物几乎都是化学合成。随着酶工程研究进展，采用酶催化法合成维生素衍生物的实例越来越多，也有不少工业化案例，如维生素 A 棕榈酸酯、维生素 C 棕榈酸酯、维生素 C 葡萄糖苷等。以下将对酶催化法合成维生素衍生物的相关研究作总结，以期推动酶催化法在维生素衍生物合成中的研究及工业化应用。

3.1 维生素 A 衍生物

维生素 A (vitamin A) 主要包括维生素 A₁ 和

维生素 A₂ 两种。维生素 A₁，即视黄醇 (或抗干眼病因子)，是一个具有脂环的不饱和一元醇，主要来源于哺乳动物及咸水鱼的肝脏中。维生素 A₂，即 3-脱氢视黄醇，主要来源于淡水鱼的肝脏中。由于维生素 A₂ 的活性比较低，所以通常所说的维生素 A 是指维生素 A₁。植物一般不能合成维生素 A，但植物来源的 β -胡萝卜素及其他胡萝卜素可在人体内合成维生素 A₁^[62]。维生素 A 及其衍生物 (如视黄醛或视黄酸等) 可促进免疫球蛋白的合成，具有维持正常视觉功能，维持骨骼正常生长发育，促进细胞生长与生殖和抑制肿瘤生长等功能^[63]。

维生素 A 是脂溶性维生素，在空气中极不稳定，紫外照射下易失活，且对皮肤有刺激性，这些特征限制了维生素 A 在医药及化妆品行业的应用。因此，工业上通常将其制成维生素 A 衍生物以克服上述缺点^[64]。维生素 A 的商品形式通常是维生素 A 的酯类衍生物。最常见的维生素 A 酯类衍生物是维生素 A 醋酸酯，而维生素 A 醋酸酯结构仍然不稳定，一般工业上会进一步将维生素 A 醋酸酯制备成维生素 A 丙酸酯、维生素 A 棕榈酸酯、维生素 A 亚油酸酯、维生素 A 乳酸酯等。除维生素 A 棕榈酸酯和维生素 A 乳酸酯外，上述维生素 A 衍生物通常采用化学法合成^[65]。传统化学法合成维生素 A 棕榈酸酯需要先合成棕榈酰氯，而棕榈酰氯的合成需要使用有毒试剂，如二氯亚砷、光气或三光气，最终由棕榈酰氯与维生素 A 反应生成维生素 A 棕榈酸酯。

随着酶催化法研究的日益深入，利用脂肪酶催化合成维生素 A 棕榈酸酯的应用已较为成熟。刘园等^[66] 通过对诺维信固定化脂肪酶 (Novozym 435) 催化维生素 A 棕榈酸酯合成的反应条件进行

了较为详细的考察,在以维生素A醋酸酯及棕榈酸为底物的条件下,实现催化转化率91%。北京化工大学谭天伟团队^[67]在脂肪酶的开发和应用方面做了系统研究,开发了来源于*Candida sp.*99-125的新型脂肪酶,并采用固定化方式合成维生素A棕榈酸酯,可实现转化率达83%,且连续使用5次以上。浙江大学于洪巍团队^[68-69]通过筛选得到酯酶*E. coli* BioH,利用该酯酶先催化维生素A醋酸酯和低级醇生成维生素A醇,再催化维生素A醇与棕榈酸酯反应合成维生素A棕榈酸酯,反应总收率可达95%。并且,通过固定化酯酶实现酶的反复套用,大大降低了维生素A棕榈酸酯的生产成本,成功应用于工业生产。

相对而言,酶法合成维生素A乳酸酯的研究较少,阮晖等^[70]通过利用酵母展示脂肪酶成功催化合成维生素A乳酸酯。高静等^[71]采用脂肪酶Novozym 435,在混合溶剂叔丁醇/正己烷=3:2(体积比)条件下催化合成维生素A乳酸酯,收率达52.19%。可以发现,诺维信公司^[72]开发的来源于南极假丝酵母(*Candida antarctica* B)的Novozym 435,是研究中最常用的脂肪酶之一。Novozym 435是商品化固定化酶,稳定性好,但对于不同的底物催化活性不一定高。自然界中脂肪酶存在广泛,为得到高活性且具有工业化价值的脂肪酶,需针对不同底物的酯化反应对脂肪酶进行筛选或改造。

3.2 维生素C衍生物

维生素C在空气中容易被氧化,限制了维生素C的工业化应用。工业上常将维生素C制备成维生素C衍生物,在保留维生素C抗氧化活性的同时拓展其应用范围。常见维生素C衍生物包括维生素C盐类(比如维生素C钠和维生素C钙),维生素C糖苷类(比如维生素C葡萄糖苷)和维生素C酯类[比如维生素C磷酸酯(镁)、维生素C棕榈酸酯、维生素C硬脂酸酯等]^[73-74]。维生素C盐类一般以化学法直接合成,而维生素C葡萄糖苷一般以酶法合成。因脂肪酶的广泛存在,应用越发成熟,维生素C酯类也越来越多采用酶法合成。不同种类的维生素C衍生物抗氧化作用有差别,应用范围也有所不同^[75]。

3.2.1 维生素C糖苷类

维生素C葡萄糖苷有多种同分异构体,包括L-抗坏血酸-2- α -葡萄糖苷(AA-2 α G)、L-抗坏血酸-2- β -葡萄糖苷(AA-2 β G)、L-抗坏血酸-5-葡萄糖苷(AA-5G)和L-抗坏血酸-6-葡萄糖苷(AA-6G)。其中,AA-2 α G因具有良好的热稳定性和生物活性受到广泛关注,且已实现酶法工业生产。AA-2 α G进入细胞后,可在 α -葡萄糖苷酶的作用下被水解成维生素C并发挥生理活性^[76]。另外,AA-2 α G还具有抗紫外线、抑制黑色素生成等美白功效,主要应用于化妆品行业^[77]。

1990年,日本林原生物化学研究所与冈山大学药理学系首次发现了AA-2 α G,并利用生物方法大量合成了该维生素C衍生物^[78-79]。迄今为止,AA-2 α G主要采用酶法将葡萄糖基转移到维生素C形成糖苷键合成。葡萄糖苷键来源(糖基供体)包括环糊精和蔗糖等。可催化合成AA-2 α G的酶包括环麦芽糊精葡聚糖转移酶(cyclomalto-dextrin glucanotransferase, CGTase, EC 2.4.1.19)、蔗糖磷酸化酶(sucrose phosphorylase, EC 2.4.1.7)、 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, EC 3.2.1.20)、 α -淀粉酶(α -amylase, EC 3.2.1.1)、葡聚糖蔗糖酶(dextranase, EC 2.4.1.5)、 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, EC 3.2.1.21)等。

CGTase本身可以催化淀粉水解成环糊精,同时也是AA-2 α G工业化生产用酶,可以利用 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精或淀粉作为糖基供体合成AA-2 α G。由于原料价格及催化效率的原因, β -环糊精在AA-2 α G工业生产中最常用。然而 β -环糊精水溶性较差,限制了CGTase酶促反应。CGTase可分为嗜常温(mesophilic)和嗜热(thermophilic)两大类,常见来源有芽孢杆菌(*Bacillus*)、类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)、梭菌(*Clostridium*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、微球菌(*Micrococcus*)、嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter*)、热球菌(*Thermococcus*)等。其中,来源于脂肪嗜热芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)^[80],环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans* strain 251)^[81-82]和浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)^[83]的CGTase研究较多,且已解析出晶体结构。

CGTase不仅可以催化糖基转移合成AA-2G,也可以合成熊果苷、甜菊糖苷或橙皮苷等。大多

数天然的CGtase酶催化活性并不高,且有副产物AA-5G或AA-6G生成。另外,CGtase的催化产物可能包括多个葡萄糖基(AA-2 α G_n),需要用糖化酶等进一步水解成AA-2 α G^[84]。李江华等^[85]通过响应面优化环麦芽糊精葡聚糖转移酶催化合成AA-2 α G,在36.5℃,pH5.4条件下实现AA-2 α G的产量为9.76 g/L,接近预测理论产量。事实证明,仅依靠自然筛选很难得到高活性且高特异性的CGtase。要想提高CGtase的催化活性和产物特异性,需要对酶进行改造。根据现有报道,对CGtase的改造方式一般有3种,定点突变、末端修饰和融合表达。江南大学刘龙团队对此有较丰富的研究,他们通过对来源于浸麻类芽孢杆菌的CGTase进行多位点组合突变获得高活性突变体(K47L/Y89F/N94P/D196Y)使AA-2 α G产物浓度达2.23 g/L,与野生酶相比提高85.8%^[86];在CGTase蛋白N端融合双亲短肽SAP6,以淀粉作为糖基供体条件下,酶的活性较原始酶提高236%^[87];另外通过融合糖基结合结构域与CGTase蛋白,以淀粉作为糖基供体条件下,可使催化活性提高4倍^[88]。根据陶秀梅等^[89]综述,目前最有潜力的CGTase来源菌株是*B. stearothermophilus*,而 α -环糊精是相对最合适的糖基供体。考虑到成本和活性,目前工业上主要以 β -环糊精作为糖基供体

蔗糖磷酸化酶主要来源于长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)^[90-91]、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、嗜糖假单胞菌(*Pseudomonas saccharophila*)等。与CGTase酶相比,蔗糖磷酸化酶的催化合成AA-2 α G的活性较低,但蔗糖磷酸化酶利用廉价蔗糖作为糖基供体,同样具有研究价值和工业化潜力。

AA-2 β G是日本学者Toyodaono等从中国的宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)和北方枸杞(*Lycium chinese* M.)干果中分离纯化得到一种新型、稳定、纯天然的AA-2 α G同分异构体。研究发现,AA-2 β G具有和维生素C类似的生理功能。AA-2 β G的合成研究较少,2009年,谢若男^[92]从产纤维素酶菌种中筛选到产糖苷转移酶的菌种,证实其具有催化合成AA-2 β G的能力,但产量不高,还有待进一步研究。

3.2.2 维生素C酯类

维生素C的酯类衍生物也有采用酶法合成的研究,最常见的是采用脂肪酶(或产脂肪酶的微生物)合成维生素C磷酸酯或维生素C棕榈酸酯。1996年,Fujio等^[93]发现维生素C与含焦磷酸盐的水溶液在微生物产生的酶催化作用下可发生酯化反应生成维生素C磷酸酯,其中,利用产黄纤维单胞菌(*Cellulomonas flavigena*)做催化反应,维生素C磷酸酯终浓度可达8.8 g/L,具有一定工业应用潜力。据2001年相关报道,日本Kyowa Hakko Kogyo公司开发了一条酶法合成维生素C磷酸酯的路线,该酶催化法是以维生素C和磷酸为原料,利用铜绿假单胞菌作全细胞催化,再经氢氧化钠中和得到维生素C磷酸酯钠盐^[94]。

维生素C棕榈酸酯的酶法合成对反应条件(特别是溶剂)有很高的要求。由于维生素C易溶于水而棕榈酸(酯)不溶于水,因此反应溶剂需要对维生素C和棕榈酸(酯)都有一定的溶解性,目前常用的溶剂是叔戊醇、叔丁醇、正己烷、丙酮等。不同的溶剂反应转化率不同,根据大量文献报道数据的分析,发现在使用相同的脂肪酶作催化剂时,叔戊醇中的转化率相对较高^[95]。另外,虽然脂肪酶可以在非水相体系中催化酯类的合成,但仍需要少量的水以维持酶本身的活性构象^[96]。同时,利用脂肪酶催化维生素C棕榈酸酯合成过程中会产生水,产生的水会影响脂肪酶催化酯合成反应速率^[97]。结合底物溶解性的因素,维生素C棕榈酸酯的酶促合成过程中,溶剂的种类和比例尤为关键。

酶法合成维生素C棕榈酸酯常用的脂肪酶仍然是Novozym 435, Lerin等^[98]采用Novozym 435通过优化反应条件,在酶用量5%条件下,可实现维生素C转化率67%。Karmee等^[99]先用化学法合成棕榈酸乙烯酯作为底物,以Novozym 435脂肪酶为催化剂,在微波辐射下,实现维生素C棕榈酸酯合成,催化转化率达80%。总体来讲,与其他脂肪酶相比,Novozym 435脂肪酶在维生素C棕榈酸酯的合成方面具有一定优势。然而Novozym 435脂肪酶价格较高,催化效率与化学法相比并无明显优势。酶法合成维生素C棕榈酸酯的大规模工业化还需要降低酶的使用成本,提高酶促反应效率,这

有赖于更高性能酶的挖掘和工业开发。

3.3 维生素E衍生物

维生素E是一种脂溶性的维生素，天然维生素E是由生育酚和生育三烯酚及两者的异构体组成的混合物。目前发现了8种异构体，包括 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚、 δ -生育酚和 α -生育三烯酚、 β -生育三烯酚、 γ -生育三烯酚、 δ -生育三烯酚^[100]。其中， α -生育酚含量最丰富且活性最高，通常所说维生素E就是指 α -生育酚。维生素E(α -生育酚)具有极强的抗氧化性，因此也极易被氧化，十分不利于贮藏和运输。工业上，通常将维生素E转化成维生素E衍生物，在保留维生素E生物活性的同时增强其稳定性，拓宽其应用范围。最常见的维生素E衍生物是维生素E酯类，比如维生素E醋酸酯、维生素E琥珀酸酯、维生素E阿魏酸酯、维生素E棕榈酸酯等。

维生素E酯类衍生物一般用化学法合成，但也有不少酶促合成的研究。南京大学黄和团队^[101]对比了市场上多种脂肪酶对维生素E酯化的催化活性，发现来源于皱褶假丝酵母(*Candida rugose*)的脂肪酶CRL的活性较好，维生素E棕榈酸酯的催化收率达到28.37%，是Novozym 435的一倍。尹春华等^[102]利用琥珀酸酐修饰诺维信Novozym 435脂肪酶，发现修饰后的酶相比原始酶可更好地催化维生素E合成维生素E琥珀酸酯，催化收率达94.4%。这些研究为酶法合成维E棕榈酸酯作了铺垫，已展示出良好的工业应用潜力。

4 总结与展望

酶作为天然的催化剂，通过对其挖掘及改造可以实现高效催化反应。酶及酶催化技术已经在生物、化工、医药等各个领域得到了广泛的应用。本文对酶工程中常用的筛选及改造方法进行了归纳总结，对目前常见维生素及其衍生物的合成中涉及的酶催化过程作了介绍。目前，工业上部分维生素的合成已采用酶催化和化学合成结合的方式生产，充分发挥生物和化学各自优势，典型案例如维生素B₃和维生素B₅。而维生素衍生物中，

维生素C葡萄糖苷均采用酶催化合成，其他衍生物既有酶法合成也有化学法合成。维生素的酯类衍生物种类较多且普遍采用化学合成法，但酶催化法已逐渐显示出绿色环保和成本优势，不少已经可以替代化学法，如维生素A棕榈酸酯、维生素C棕榈酸酯等。本文对上述各类维生素及其衍生物的酶法合成情况作了总结(表1)。

目前工业上应用的生物合成技术可分为生物发酵和生物催化。生物发酵的目标是利用天然可再生资源，在培养微生物过程中合成各类化学品。而生物催化是利用酶(包括固定化酶和固定化细胞)作为催化剂合成化学品。对于某些天然产物，比如维生素B₅、维生素D₃，其天然合成过程往往很复杂，要想利用生物发酵直接生产，首先要获得高效合成能力的菌株。这就需要对微生物进行大规模筛选或复杂的分子生物学改造。而另一些合成路线简单的产品，比如维生素B₁，化学合成法通常较为成熟，要想以生物发酵方式替代化学法往往缺乏成本竞争力。生物催化的目标是为了针对性地替代化学合成反应或者路线。与化学法相比，酶催化具有生物合成技术常见优势，比如反应条件温和、安全性高、具有化学和光学选择性、杂质生成少等。与生物发酵相比，酶催化也有其独特优势：①不依赖活细胞，生物安全性更高；②不用考虑细胞本身耐受性和生长条件，对底物和催化体系耐受范围更广，如水相、有机相和离子液体等；③酶的应用形式更多，比如酶和全细胞及其固定化形式，应用范围更加广泛^[103]。酶催化也有诸多不足之处：酶的种类繁多，但天然的酶活性往往无法满足工业化需求；有的酶催化依赖特定辅因子，增加了应用难度；要在现有产品的化学合成路线中应用酶催化工艺，往往需要重新设计合成路线。然而，酶作为一种绿色催化剂，其应用不断拓展，酶催化作为绿色合成工艺已被大众认可^[104]。

酶本质上是一种生物大分子，对酶的理解和应用需要生物、化学和计算机等多学科共同推动。化学化工和酶工程结合可深入理解酶催化反应机制、拓展酶应用方式；合成生物学的发展可为酶的表达设计提供丰富的分子生物学原件和策略；计算机科学等技术的发展是酶结构预测及动力学

- nal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2020, 51(5): 797-803.
- [6] 汪春蕾, 田菲, 张月颖, 等. 耐盐 *Bacillus* sp.9BS 的筛选及其对染料的脱色效果[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(3): 313-317.
WANG C L, TIAN F, ZHANG Y Y, et al. Screening of a salt-tolerant *Bacillus* sp. 9BS and its decoloring effect on dye[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2015, 41(3): 313-317.
- [7] JHA R K, STRAUSS C E M. Smart microbial cells couple catalysis and sensing to provide high-throughput selection of an organophosphate hydrolase[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(6): 1234-1239.
- [8] YUAN B, MAHOR D, FEI Q, et al. Water-soluble anthraquinone photocatalysts enable methanol-driven enzymatic halogenation and hydroxylation reactions[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(15): 8277-8284.
- [9] SANKET A S, GHOSH S, SAHOO R, et al. Molecular identification of acidophilic manganese (Mn) -solubilizing bacteria from mining effluents and their application in mineral beneficiation[J]. Geomicrobiology Journal, 2017, 34(1): 71-80.
- [10] KELLY S A, MEGAW J, CASWELL J, et al. Isolation and characterisation of a halotolerant ω -transaminase from a Triassic period salt mine and its application to biocatalysis[J]. ChemistrySelect, 2017, 2(30): 9783-9791.
- [11] DALBØGE H, LANGE L. Using molecular techniques to identify new microbial biocatalysts[J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16(6): 265-272.
- [12] DANIEL L, BURYSKA T, PROKOP Z, et al. Mechanism-based discovery of novel substrates of haloalkane dehalogenases using in silico screening[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2015, 55(1): 54-62.
- [13] MIRETE S, MORGANTE V, GONZÁLEZ-PASTOR J E. Functional metagenomics of extreme environments[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 38: 143-149.
- [14] VIMAL A, KUMAR A. *In vitro* screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2017, 98: 9-17.
- [15] SUN Y, WANG G, JING Z, et al. Microfluidic pneumatic printed sandwiched microdroplet array for high-throughput enzymatic reaction and screening[J]. SLAS Technology, 2020, 25(5): 446-454.
- [16] JHA R K, KERN T L, FOX D T, et al. Engineering an *Acinetobacter* regulon for biosensing and high-throughput enzyme screening in *E. coli* via flow cytometry[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(12): 8150-8160.
- [17] NOZERET K, PERNIN A, BUDELMEIJER N. Click-chemistry based fluorometric assay for apolipoprotein *N*-acyltransferase from enzyme characterization to high-throughput screening[J]. Journal of Visualized Experiments, 2020(159): 61146.
- [18] ARAI K. Assay in high throughput screening[J]. Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacologica Japonica, 2001, 118(2): 81-88.
- [19] WAHLER D, REYMOND J L. High-throughput screening for biocatalysts[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12(6): 535-544.
- [20] ZHAO H, ARNOLD F H. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(6): 1307-1308.
- [21] ZHAO H M, ARNOLD F H. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1999, 12(1): 47-53.
- [22] ZENG W Z, XU B B, DU G C, et al. Integrating enzyme evolution and high-throughput screening for efficient biosynthesis of L-DOPA[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2019, 46(12): 1631-1641.
- [23] CHOI J M, KIM H-S. Structure-guided rational design of the substrate specificity and catalytic activity of an enzyme [M]// TAWFIK D S. Enzyme Engineering and Evolution: General Methods. Elsevier, 2020: 181-202.
- [24] WIJMA H J, FLOOR R J, BJELIC S, et al. Enantioselective enzymes by computational design and in silico screening[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(12): 3726-3730.
- [25] ABDELSALAM M A, ABOULWafa O M, M BADAWEY E S A, et al. Design, synthesis, anticancer screening, docking studies and in silico ADME prediction of some β -carboline derivatives[J]. Future Medicinal Chemistry, 2018, 10(10): 1159-1175.
- [26] BASSO A, SERBAN S. Industrial applications of immobilized enzymes—a review[J]. Molecular Catalysis, 2019, 479: 110607.
- [27] RIGOLDI F, DONINI S, REDAELLI A, et al. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications[J]. APL Bioengineering, 2018, 2(1): 011501.
- [28] ASANO Y, TANI Y, YAMADA H. A new enzyme “nitrile hydratase” which degrades acetonitrile in combination with amidase[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1980, 44(9): 2251-2252.
- [29] YAMADA H, KOBAYASHI M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(9): 1391-1400.
- [30] KUBÁČ D, KAPLAN O, ELIŠÁKOVÁ V, et al. Biotransformation of nitriles to amides using soluble and immobilized ni-

- trile hydratase from *Rhodococcus erythropolis* A4[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008, 50(2/3/4): 107-113.
- [31] NAGASAWA T, NANBA H, RYUNO K, et al. Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. Purification and characterization[J]. European Journal of Biochemistry, 1987, 162(3): 691-698.
- [32] KOMEDA H, KOBAYASHI M, SHIMIZU S. Characterization of the gene cluster of high-molecular-mass nitrile hydratase (HNHase) induced by its reaction product in *Rhodococcus rhodochrous* J1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(9): 4267-4272.
- [33] OKAMOTO S, ELTIS L D. Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. RHA1[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(3): 828-838.
- [34] 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.
- [35] 刘丽秀, 范鲁娜. D-泛酸钙合成技术综述[J]. 湖南化工, 1999, 29(4): 13-15.
- LIU L X, FAN L N. An introduction to synthesis of D-calcium pantothenate[J]. Hunan Chemical Industry, 1999, 29(4): 13-15.
- [36] CHEN B, FAN L Q, XU J H, et al. Biocatalytic properties of a recombinant *Fusarium proliferatum* lactonase with significantly enhanced production by optimal expression in *Escherichia coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(3): 744-756.
- [37] 汤一新, 孙志浩, 华蕾, 等. D-泛解酸内酯水解酶产生菌的筛选及产酶条件研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(1): 81-87.
- TANG Y X, SUN Z H, HUA L, et al. Production of D-pantolactone hydrolase by *Fusarium moniliforme* SW-902[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(1): 81-87.
- [38] 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.
- [39] 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, 31(3): 1-5.
- TANG Y X, SUN Z H, HUA L, et al. Optical resolution of racemic DL-pantolactone by a fungal enzyme, D-lactonohydrolase[J]. Industrial Microbiology, 2001, 31(3): 1-5.
- [40] FORD J H, BUC S R, GREINER J W. An improved synthesis of β -alanine (III): The addition of ammonia to acrylonitrile at 50-150°C [J]. Journal of the American Chemical Society, 1947, 69(4): 844-846.
- [41] 李博, 彭俊华, 李继涛, 等. 一种采用微通道反应器制备 β -氨基丙酸的方法: CN108892621A [P]. 2018-11-27.
- LI B, PENG J H, LI J T, et al. A method for preparing β -alanine by micro-channel reactor: CN108892621A[P]. 2018-11-27.
- [42] XU J, ZHU Y, ZHOU Z M. Systematic engineering of the rate-limiting step of β -alanine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2021, 51: 88-94.
- [43] ZOU X Y, GUO L X, HUANG L L, et al. Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of β -alanine in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(6): 2545-2559.
- [44] CRONAN J E Jr. Beta-alanine synthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1980, 141(3): 1291-1297.
- [45] LI R F, WIJMA H J, SONG L, et al. Computational redesign of enzymes for regio- and enantioselective hydroamination[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14(7): 664-670.
- [46] 吴边, 刘洋, 李瑞峰, 等. 天冬氨酸酶变体及其制备方法与应用: CN109385415A[P]. 2019-02-26.
- WU B, LIU Y, LI R F, et al. Aspartase variant, preparation method and applications thereof: CN109385415A[P]. 2019-02-26.
- [47] 范文超, 王金刚, 梁岩, 等. 一种天冬氨酸氨裂合酶突变体及其应用: CN110791493B[P]. 2021-03-09.
- FAN W C, WANG J G, LIANG Y, et al. Aspartate ammonia lyase mutant and application thereof: CN110791493B[P]. 2021-03-09.
- [48] 尹光琳, 陶增鑫, 于龙华, 等. L-山梨糖发酵产生维生素C前体——2-酮基-L-古龙酸的研究I. 菌种的分离筛选和鉴定[J]. 微生物学报, 1980, 20(3): 246-251.
- YIN G L, TAO Z X, YU L H, et al. Studies on the production of vitamin C precursor—2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose by fermentation (I): Isolation, screening and identification of 2-keto-L-gulonic acid producing bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1980, 20(3): 246-251.
- [49] URBANCE J W, BRATINA B J, STODDARD S F, et al. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 3): 1059-1070.
- [50] WANG P P, ZENG W Z, XU S, et al. Current challenges facing one-step production of L-ascorbic acid[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(7): 1882-1899.
- [51] GLIESE N, KHODAVERDI V, GÖRISCH H. The PQQ biosynthetic operons and their transcriptional regulation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192(1): 1-14.
- [52] XIONG X H, ZHI J J, YANG L, et al. Complete genome sequence of the *Bacterium methylovorus* sp. strain MP688, a

- high-level producer of pyrroloquinolone quinone[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(8): 2080.
- [53] KAY C W M, MENNENGA B, GÖRISCH H, et al. Structure of the pyrroloquinoline quinone radical in quinoprotein ethanol dehydrogenase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(3): 1470-1476.
- [54] DAVIDSON V L. Electron transfer in quinoproteins[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 428(1): 32-40.
- [55] CHEN Y, LIU L, YU S Q, et al. Identification of gradient promoters of *gluconobacter oxydans* and their applications in the biosynthesis of 2-keto-L-gulonic acid[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 673844.
- [56] ZENG W Z, WANG P P, LI N, et al. Production of 2-keto-L-gulonic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 318: 124069.
- [57] DI ROSA M, MALAGUARNERA L, NICOLOSI A, et al. Vitamin D₃: an ever green molecule[J]. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 2013, 5(1): 247-260.
- [58] HORSTING M, DELUCA H F. *In vitro* production of 25-hydroxycholecalciferol[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1969, 36(2): 251-256.
- [59] SASAKI J, MIYAZAKI A, SAITO M, et al. Transformation of vitamin D₃ to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ via 25-hydroxyvitamin D₃ using *Amycolata* sp. strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 38(2): 152-157.
- [60] SASAKI J, MIKAMI A, MIZOUE K, et al. Transformation of 25- and 1 α -hydroxyvitamin D₃ to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ by using *Streptomyces* sp. strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(10): 2841-2846.
- [61] FUJII Y, KABUMOTO H, NISHIMURA K, et al. Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D₃ hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 385(2): 170-175.
- [62] CHEW B P. Vitamin A and β -carotene on host defense[J]. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70(12): 2732-2743.
- [63] BLOMHOFF R, GREEN M H, NORUM K R. Vitamin A: physiological and biochemical processing[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1992, 12: 37-57.
- [64] 金淑芳, 李传茂, 林盛杰. 维生素及其衍生物在头皮护理产品中的应用[J]. *广东化工*, 2019, 46(24): 70-71.
- JIN S F, LI C M, LIN S J. Application of vitamins and their derivatives in scalp care products[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2019, 46(24): 70-71.
- [65] 沈润溥, 皮士卿, 谢斌, 等. 维生素A衍生物合成工艺的改进[J]. *应用化学*, 2003, 20(12): 1211-1213.
- SHEN R P, PI S Q, XIE B, et al. An improved method for synthesis of vitamin A derivatives via Wittig-Horner reaction[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2003, 20(12): 1211-1213.
- [66] 刘园, 倪辉, 蔡慧农, 等. 反应条件对固定化脂肪酶转酯化合成维生素A棕榈酸酯的影响研究[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(1): 75-82.
- LIU Y, NI H, CAI H N, et al. Study on reaction conditions for immobilized lipase synthesizing retinol palmitate by transesterification[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(1): 75-82.
- [67] 李宏亮, 胡晶, 谭天伟. 固定化脂肪酶合成维生素A棕榈酸酯[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(5): 817-820.
- LI H L, HU J, TAN T W. Immobilized lipase catalyzed synthesis of vitamin A palmitate[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(5): 817-820.
- [68] 于洪巍, 覃广德, 吕国锋, 等. 固定化酯酶 *E. coli* BioH 催化合成维生素A棕榈酸酯的方法: CN104673870A [P]. 2015-06-03.
- YU H W, QIN G D, LÜ G F, et al. Synthesis of vitamin A palmitate catalyzed by immobilized esterase *E. coli* BioH, CN104673870A [P]. 2015-06-03.
- [69] WU X F, YANG S L, YU H W, et al. Improved enantioselectivity of *E. coli* BioH in kinetic resolution of methyl (*S*)-3-cyclohexene-1-carboxylate by combinatorial modulation of steric and aromatic interactions[J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2019, 83(7): 1263-1269.
- [70] 阮晖, 徐娟, 地里热巴, 等. 酵母展示脂肪酶催化合成维生素A乳酸酯的方法: CN102212602A [P]. 2011-10-12.
- RUAN H, XU J, DILIREBA, et al. Method for synthesizing vitamin A lactate by catalysis of yeast display lipase: CN102212602 A [P]. 2011-10-12.
- [71] 高静, 姜艳军, 马丽, 等. 混合溶剂中酶促合成维生素A乳酸酯[J]. *分子催化*, 2006, 20(4): 346-350.
- GAO J, JIANG Y J, MA L, et al. Lipase catalyzed synthesis of vitamin A lactate in mixed solvent system[J]. *Journal of Molecular Catalysis*, 2006, 20(4): 346-350.
- [72] ANDERSON E M, LARSSON K M, KIRK O. One biocatalyst-many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1998, 16(3): 181-204.
- [73] 谷雪贤. 维生素C衍生物的制备及其在化妆品中的应用[J]. *化学试剂*, 2011, 33(4): 325-328.
- GU X X. Preparation of L-ascorbic acid derivatives and their application in cosmetics[J]. *Chemical Reagents*, 2011, 33(4): 325-328.
- [74] 张彦玲, 刘建峰, 齐永斌. 维生素C衍生物的现状与发展[J]. *河北化工*, 2005, 28(3): 18-19, 21.

- ZHANG Y L, LIU J F, QI Y B. Status and development of the VC derivatives[J]. Hebei Chemical Engineering and Industry, 2005, 28(3): 18-19, 21.
- [75] TAKEBAYASHI J, TAI A, GOHDA E, et al. Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-*O*-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: a kinetic and stoichiometric study[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(4): 766-771.
- [76] WAKAMIYA H, SUZUKI E, YAMAMOTO I, et al. Vitamin C activity of 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in Guinea pigs[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1992, 38(3): 235-245.
- [77] SAYO N, SEIJI K, WATARU H. Powdery cosmetic: WO2013065705A1 [P]. 2013-05-10.
- [78] YAMAMOTO I, MUTO N, NAGATA E, et al. Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1035(1): 44-50.
- [79] MUTO N, SUGA S, FUJII K, et al. Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucosidase [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2006, 54(7): 1697-703.
- [80] AGA H, YONEYAMA M, SAKAI S, et al. Synthesis of 2-*O*- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(7): 1751-1756.
- [81] VAN DER VEEN B A, VAN ALEBEEK G J, UITDEHAAG J C, et al. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed *via* different kinetic mechanisms[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(3): 658-665.
- [82] VAN DER VEEN B A, UITDEHAAG J C M, PENNINGA D, et al. Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production[J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 296(4): 1027-1038.
- [83] JIANG Y J, ZHOU J, WU R F, et al. Heterologous expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* in *Escherichia coli* and its application in 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid production[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 53.
- [84] JUN H K, BAE K M, KIM S K. Production of 2-*O*- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid using cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus* sp[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(21): 1793-1797.
- [85] 李江华, 张子臣, 刘龙, 等. 响应面法优化酶法转化合成维生素C糖苷(AA-2G)条件的研究[J]. 工业微生物, 2011, 41(6): 1-5.
- LI J H, ZHANG Z C, LIU L, et al. Process optimization of enzymatic glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G) synthesis by response surface methodology[J]. Industrial Microbiology, 2011, 41(6): 1-5.
- [86] LIU L, XU Q Y, HAN R Z, et al. Improving maltodextrin specificity for enzymatic synthesis of 2-*O*-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by site-saturation engineering of subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 166(4): 198-205.
- [87] HAN R Z, LI J H, SHIN H D, et al. Fusion of self-assembling amphipathic oligopeptides with cyclodextrin glycosyltransferase improves 2-*O*-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis with soluble starch as the glycosyl donor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(15): 4717-4724.
- [88] HAN R Z, LI J H, SHIN H D, et al. Carbohydrate-binding module-cyclodextrin glycosyltransferase fusion enables efficient synthesis of 2-*O*-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid with soluble starch as the glycosyl donor[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(10): 3234-3240.
- [89] TAO X M, SU L Q, WU J. Current studies on the enzymatic preparation 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid with cyclodextrin glycosyltransferase[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2019, 39(2): 249-257.
- [90] KWON T, KIM C T, LEE J H. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum*[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(4): 611-615.
- [91] GUDIMINCHI R K, NIDETZKY B. Walking a fine line with sucrose phosphorylase: efficient single-step biocatalytic production of L-ascorbic acid 2-glucoside from sucrose[J]. ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology, 2017, 18(14): 1387-1390.
- [92] 谢若男. 生物法生产新型抗氧化剂 2-*O*- β -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
- XIE R N. Study on enzymatic synthesis of 2-*O*- β -glucopyranosyl-L-ascorbic acid[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2009.
- [93] FUJIO T, MARUYAMA A, KOIZUMI S. Process for the preparation of ascorbic acid-2-phosphate: US 5212079[P]. 1993-05-18.
- [94] 陈亮寰. 国外化工信息[J]. 化工进展, 2001, 20(2): 58-60.
- CHEN L H. Chemical engineering information [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2001, 20(2): 58-60.
- [95] 汤鲁宏, 张浩. 非水相脂肪酶催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 363-367.
- TANG L H, ZHANG H. Studies on lipase-catalyzed synthesis

- of L-ascorbyl palmitate in non-aqueous phase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(3): 363-367.
- [96] ZAKS A, KLIBANOV A M. The effect of water on enzyme action in organic media[J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(17): 8017-8021.
- [97] HUMEAU C, GIRARDIN M, ROVEL B, et al. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate[J]. Journal of Biotechnology, 1998, 63(1): 1-8.
- [98] LERIN L A, RICETTI A, DALLAGO R, et al. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in organic solvents: process optimization and kinetic evaluation[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(3): 1068-1076.
- [99] KARMEE S K. A two step chemo-enzymatic method for the synthesis of fatty acid ascorbyl esters[J]. Journal of Oil Palm Research, 2012, 24: 1518-1523.
- [100] BOUTS T, GASTHUYS F. The importance of vitamin E in zoo mammals[J]. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 2003, 72 (2): 125-129.
- [101] JIANG X J, HU Y, JIANG L, et al. Synthesis of vitamin E succinate from *Candida rugosa* lipase in organic medium[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2013, 29(2): 223-226.
- [102] YIN C H, ZHANG C, GAO M. Enzyme-catalyzed synthesis of vitamin E succinate using a chemically modified novozym-435[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2011, 19(1): 135-139.
- [103] DE CARVALHO C C R. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(1): 75-83.
- [104] KIRK O, BORCHERT T V, FUGLSANG C C. Industrial enzyme applications[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(4): 345-351.



通讯作者: 于洪巍(1972—),男,博士,教授。长期从事生物催化研究,致力于利用蛋白质工程和代谢工程手段提高化学品的生物合成效率。

E-mail: yuhongwei@zju.edu.cn



第一作者: 王盼盼(1990—),男,博士。研究方向为维生素类产品的生物合成,长期从事酶改造、酶催化和发酵工艺优化相关研发工作。

E-mail: wpan2016@sina.com