

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 1 月 6 日 (06.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/001939 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 7/42 (2006.01) *C12P 13/04* (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/102698

(22) 国际申请日: 2021 年 6 月 28 日 (28.06.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010595583.2 2020年6月28日 (28.06.2020) CN

(72) 发明人: 及

(71) 申请人: 张科春 (ZHANG, Kechun) [CN/CN]; 中国
浙江省杭州市西湖区转塘街道转江街228号保利未来
域人才公寓7-2-801, Zhejiang 310000 (CN)。

(72) 发明人: 王吉龙 (WANG, Jilong); 中国浙江省
杭州市西湖区转塘家园 34 幢 2 单元 401,
Zhejiang 310000 (CN)。

(74) 代理人: 北京植德律师事务所 (MERITS & TREE);
中国北京市东城区东直门南大街 1 号来福士
中心办公楼 5 层, Beijing 100007 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(54) **Title:** METHODS FOR PREPARING PANTOIC ACID, PANTOTHENIC ACID AND PANTHENOL AS WELL AS SALTS THEREOF

(54) 发明名称: 一种泛解酸、泛酸、泛醇及其盐的制备方法

(57) **Abstract:** Methods for preparing pantoic acid, pantothenic acid and panthenol as well as salts thereof, which are obtained by fermenting substrate 2-hydroxy-3,3-dimethyl-4-aldehydobutyric acid by using bacteria or yeast. A microorganism is selected from bacteria or fungi. The microorganism is selected from wild or genetically engineered Escherichia coli, Bacillus, Corynebacterium, yeast or Streptomyces. According to the method for preparing the pantothenic acid, the pantothenic acid is obtained by chemically reacting the pantoic acid obtained by the method above with β -alanine. According to the method for preparing the panthenol, the panthenol is obtained by chemically reacting the pantoic acid obtained by the method above with β -alaninol.

(57) **摘要:** 一种泛解酸、泛酸、泛醇及其盐的制备方法, 通过将底物 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸经细菌或酵母发酵得到。所述微生物选自细菌或真菌; 所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、酵母或链霉菌。一种泛酸的制备方法, 将上述方法得到的泛解酸与 β -丙氨酸进行化学反应得到。一种泛醇的制备方法, 将上述方法得到的泛解酸与 β -丙氨醇进行化学反应得到。

WO 2022/001939 A1

一种泛解酸、泛酸、泛醇及其盐的制备方法

本申请要求享有在先申请的申请日为 2020 年 6 月 28 日，申请号为 202010595583.2，名称为“一种泛解酸、泛酸及其盐、泛醇的制备方法及其应用”的中国发明专利申请的优先权。

技术领域

本申请涉及生化合成技术领域，尤其涉及一种泛解酸、泛酸、泛醇及其盐的制备方法。

背景技术

泛酸是也称维生素 B5。泛解酸是生产泛酸、泛醇的一种重要的中间产物。D-泛酸钙是 D-泛酸在商业上最为重要的产品形式，已广泛应用于医药，饲料和食品行业。D-泛酸或维生素 B5 是维生素 B 复合物的成员，其是哺乳动物天然所需的。细胞中，泛酸主要用于辅酶 A(CoA) 和酰基载体蛋白(ACP)的生物合成。这些辅酶对于所有细胞来说都是重要的，它们参与细胞代谢中超过 100 种不同的中间反应。泛醇是泛酸衍生物之一，D-泛醇主要用于配制护发制品和局部使用的化妆品，可以防治小皱纹、炎症、日晒、糜烂，防止脱发，促进生发。

目前 D-泛酸钙的合成方法是先将 β -氨基丙酸、 α -羟基- β,β' -二甲基- γ -丁内酯（泛解酸内酯）和金属钙反应，生成 DL-泛酸钙，再进行拆分得 D-泛酸钙。泛解酸内酯的制备主要采用异丁醛-甲醛-氢氰酸法（US.4020103, 1977; JP.47-35314, 1973; JP.49-41361, 1974）和异丁醛-醛乙酸法（JP.55-62080, 1980）。异丁醛-甲醛-氢氰酸法，该方法以异丁醛和甲醛经羟甲基化制得 α,α -二甲基- β -羟基丙醛，再与氢氰酸发生氰醇化反应生成 α,γ -二羟基- β,β -二甲基丁腈，经酸水解得到 α,γ -二羟基- β,β -二甲基丁酸（泛解酸），然后将其脱水内酯化即得 DL-泛内酯。所谓的异丁醛-羟乙腈法实际是该方法的改进，不直接用氢氰酸，而用羟乙腈代替，但羟乙腈仍是有甲醛和氢氰酸加成而得。所谓的异丁醛-羟乙腈法实际是该方法的改进，不直接用氢氰酸，而用羟乙腈代替，但羟乙腈仍是有甲醛和氢氰酸加成而得。这种方法存在的主要问题是需要经过羟甲基化、氰醇化、水解、内酯化等多步反应，反应中要使用剧毒的氢氰酸，对技术要求高，给管理、使用带来很大的麻烦，同时也增加了采取有关安全措施所需的费用。异丁醛-乙醛酸法有两种不同工艺：缩合-歧化工艺（JP.55-62080, 1980）由异丁醛和乙醛酸进行羟醛缩合，再与另一分子乙醛酸歧化、脱水环化生成泛解酸内酯；缩合-加氢工艺（EP0171046）则是将羟醛缩合产物在 250bar 的高压下进行催化加氢制备 DL-泛内酯。前者由于采用两倍量的乙醛酸和产生大量废水，经济性和环保性差而没有竞争力；后者由于在需 250bar 的高压，而造成使设备成本、维护费用高和安全性差，极大程度上限制了其应用。

为克服上述缺陷，以及为了改进对泛酸、D-泛酸盐等的生产，近年来微生物合成方法已成为研究主题，也已得到了发展。纯微生物合成方法因为产率低，一直没有用于工业生产（EP2163629）。现在工业方法都是用化学法生成前体，然后酶拆分得到手性 D-泛酸。

发明内容

本发明提出一种新的泛解酸、泛酸、泛醇及其盐的制备方法，能至少部分地解决上述技术问题。

本发明目的之一是提供一种泛解酸、泛酸或泛醇的制备方法，将 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸经细菌或酵母发酵转化成泛解酸、泛酸或者泛醇。

本发明目的之二是提供一种 D-泛酸的制备方法，包括：1) 将 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸经细菌或酵母发酵转化成泛解酸；2) 将所述泛解酸与 β -丙氨酸反应得到 D-泛酸。

本发明目的之三是提供一种 D-泛醇的制备方法，包括：1) 将 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸经细菌或酵母发酵转化成泛解酸；2) 将所述泛解酸与 β -丙二醇反应得到 D-泛醇。

本发明提供的上述制备方法，对于 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸，醛基无需经过体外还原，可直接进行发酵，利用生物体内还原酶将 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸还原为 2,4-二羟基-3,3-二甲基-丁酸。此方法利用成本低的原料，又避免了有毒的氰化物，和成本高昂的手性拆分步骤。

具体实施方式

在本公开中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。同时，为了更好地理解本公开，下面提供相关术语的定义和解释。

也应理解本文使用的术语仅是为了描述具体实施方式的目的，并不意欲是限制性的。

如本文使用的和除非另作说明，术语“泛解酸”是 2,4-二羟基-3,3-二甲基丁酸。术语“泛酸”是指 2,4-二羟基-3,3-二甲基丁酰- β -丙氨酸。术语“泛醇”是指 2,4-二羟基-N-(3-羟丙基)-3,3-二甲基丁酰胺。

术语“扩增”是指微生物中由适当 DNA 编码的一种或多种酶的细胞内活性例如通过增加基因拷贝数、使用强启动子或使用编码具有高活性的适当酶的基因以及选择性地结合这些方法而得到提高。

术语“野生”指在自然界中可以找到的对象。

除非具体陈述，术语“第一”、“第二”不表示任何次序或重要性，而是使用术语第一、第二等来区分一个对象与另一对象。

如本文使用的和除非另作说明，术语“大约”指的是可测量的值诸如量、时间期间等时，表示包括从给定值 $\pm 10\%$ 的变化，更优选 $\pm 5\%$ ，甚至更优选 $\pm 1\%$ ，和还要更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化，只要这种变化适于实施公开的方法。

如上所述，本发明的目的之一在于提供一种泛解酸、泛酸、泛醇及其盐的制备方法，安全环保，产率较高。

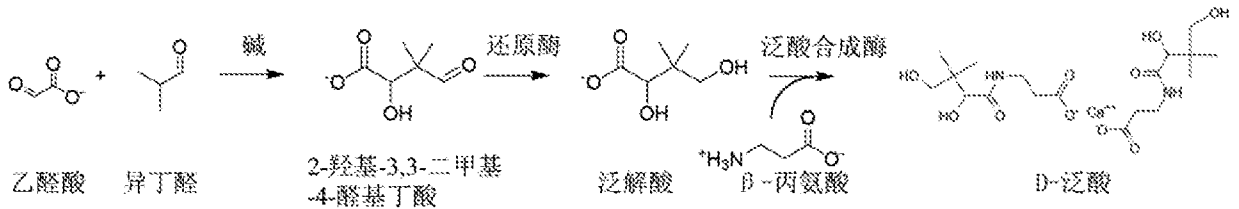
本发明的一些实施方式公开了泛解酸、泛酸、泛醇及其盐的制备方法，将 2-羟基-3,3-

二甲基-4-醛基丁酸加入到培养基中作为发酵底物，通过细菌或真菌将发酵底物进行发酵得到。

根据本发明的一些实施方式，其中，当发酵底物不含有 β -丙氨酸时，经细菌或真菌发酵得到泛解酸较多，而泛酸较少。

根据本发明的一些实施方式，其中，将 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸和 β -丙氨酸同时加入到培养基中作为发酵底物发酵，可同时得到泛解酸和泛酸，生成的泛酸量将明显增多。

本发明制备泛解酸和泛酸的反应机理如下：



其中，在生成泛解酸后，后续生成泛酸可用已公开报道的化学方法或生物发酵方法实现；将 β -丙氨酸替换为 β -丙氨酸醇能够生成泛醇，同样可用已公开报道的化学方法或生物发酵方法实现。根据本发明的一些实施方式，其中，细菌或真菌包括但不限于野生或者基因工程改造过的大肠杆菌、芽孢杆菌、酵母、棒状杆菌或链霉菌。例如大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。

根据本发明的一些实施方式，其中，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠杆菌；可选地，所述微生物选自重组大肠杆菌，所述重组大肠杆菌含有表达还原酶的外源基因，其中所述还原酶包括 YqhD、YqhE、DkgA、AdhE、yihU、Adh1、ADH2、ADH5 或 ADH6。

根据本发明的一些实施方式，其中，将所述 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸发酵的酶是能把醛类转化成醇类的还原酶。所述还原酶包括但不限于野生或者基因工程改造过的 YqhD、YqhE、AdhE、DkgA、Adh1、Adh2、Adh5、ADH6 或 yihU。

根据本发明的一些实施方式，其中，将 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸发酵转化成泛解酸、泛酸或者泛醇的所述转化是利用所述还原酶在所述细菌或真菌体内完成。

根据本发明的一些实施方式，其中，将 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸发酵转化成泛解酸、泛酸或者泛醇的所述转化的条件是在 20-40 °C，加上碳源进行发酵。所述碳源包括但不限于葡萄糖，淀粉等。当采用耐高温菌或耐高温酶进行发酵时，发酵温度可达 90°C，发酵温度可以为大约 20°C，大约 30°C，大约 35°C，大约 65°C，大约 90°C。

发酵时可根据发酵需求加入 pH 调节剂。采用碳酸钙、氢氧化钙、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、碳酸钾或氢氧化钾调节 pH，发酵产物泛酸和 pH 调节剂生成对应的盐，得到泛酸钙、泛酸钾、泛酸钠或泛酸铵。

根据本发明的一些实施方式，其中，所述 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸是经乙醛酸与异

丁醛缩合制得的。缩合反应可用已公开报道的制备方法实现。

另一方面，本发明提供了一种泛酸及其盐的制备方法，将发酵得到的泛解酸与 β -丙氨酸反应得到。

本发明提供了一种D-泛酸的制备方法，包括：1) 将2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸经细菌或酵母发酵转化成泛解酸；2) 将所述泛解酸与 β -丙氨酸反应得到D-泛酸。

另一方面，本发明提供了一种泛醇的制备方法，将发酵得到的泛解酸与 β -丙二醇反应得到。

以下实施例中加入的原料试剂或使用的仪器或操作步骤均是本领域普通技术人员可常规确定的内容。

实施例

材料与amp;方法

本发明实例所用的DNA聚合酶Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒ClonExpress®II One Step Cloning Kit和琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

DNA电泳使用西班牙琼脂糖(Biowest Agarose)。

胰蛋白胨、酵母粉、D-(+)-葡萄糖、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钙、氯化铵、D-泛酸钙、 β -丙氨酸、IPTG、硫胺素和硫酸卡那霉素均购自上海生工。

碳酸钙、氢氧化钠和硫酸镁购自国药。

乙醛酸和异丁醛购自阿拉丁。

配制固体培养基使用的琼脂粉购自上海盛思。

质粒构建测序验证由金唯智完成。

LB培养基成分：胰蛋白胨10g/L，酵母粉5g/L，氯化钠10g/L，固体培养基中添加1.5%的琼脂粉。

抗生素浓度为：硫酸卡那霉素50 μ g/mL。

发酵底物2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸是经乙醛酸与异丁醛以现有常规方法缩合制得。

发酵培养基组分：

组分	浓度
M9 盐	1 X
硫酸镁	1 mM
氯化钙	0.1 mM

硫胺素	0.01 mg/mL
D-葡萄糖	40 g/L
酵母粉	5 g/L
IPTG	1 mM
β -丙氨酸	0 或 7.5 g/L
2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸	10 g/L
硫酸卡那霉素	50 μ g/mL

泛解酸和泛酸的检测方法：使用配备伯乐色谱柱（1250140 Aminex HPX-87H Column 300 x 7.8mm）的 HPLC-RID 定量检测泛酸。

实施例 1 大肠杆菌还原酶表达载体构建

根据 NCBI 公布的大肠杆菌 MG1655 的基因组序列分别设计引物：

yqhE_F(gaccgaattcattaaaggagagaaaggtaccatggctaaccaaccgttattaagctacag)/yqhE_R(ctttcggtttatttgatgcctctagagctagcttagccgccgaactggcaggtatcgggaccgag)

和

yihU_F(gaccgaattcattaaaggagagaaaggtaccatggcagcaatcgctttatcggtttagg)/yihU_R(ctttcggtttatttgatgcctctagagctagcttagcttttactttggcagtcacccggcactg)

以 MG1655 基因组为模板通过 PCR 扩增分别得 yqhE 和 yihU 基因，并通过非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒将其连接到含有 IPTG 诱导型启动子的 pZA 载体上，转化 BW25113 感受态细胞，涂布硫酸卡那霉素抗性平板过夜培养，挑阳性克隆进行测序验证，正确的重组载体分别命名为 pZA-yqhE 和 pZA-yihU。

实施例 2 重组大肠杆菌发酵生产泛解酸和泛酸

将上述重组菌单菌落分别接种 2 mL 含有 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基，37°C，220rpm 过夜培养（约 14h）。按照初始 OD 为 0.05 转接装有 5 mL 发酵培养基的 100mL 三角瓶，30°C，220rpm 培养。每个发酵瓶中加入 0.5 g CaCO₃ 调节发酵液的 pH。培养 24h 后收集发酵液，检测泛解酸和泛酸的浓度（参见下面表格）。YqhE 和 YihU 蛋白促进底物 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸还原成泛解酸。当发酵液中添加另一种底物 β -丙氨酸后，可以生产终产物泛酸。但该发酵结果显示将泛解酸转化成泛酸的代谢途径存在限速步骤，为提高泛酸的产量，需进一步提高下游代谢途径所需要的酶的表达。本实施例中采用 CaCO₃ 调节发酵液中的 pH，发酵产物泛酸在发酵液中生成泛酸钙。如果加入 NaOH、KOH 或氨水调节发酵液中的 pH，发酵液中相应地将生成泛酸的钠盐、钾盐、铵盐。

菌株	底物		产物 (g/L)	
	2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸	β -丙氨酸	泛解酸	泛酸
BW25113	10 g/L	0 g/L	3.7	0.0
BW25113/pZA-yqhE	10 g/L	0 g/L	6.9	0.1
BW25113/pZA-yihU	10 g/L	0 g/L	7.6	0.1
BW25113	10 g/L	7.5 g/L	1.8	4.4
BW25113/pZA-yqhE	10 g/L	7.5 g/L	4.8	3.9
BW25113/pZA-yihU	10 g/L	7.5 g/L	3.1	6.4

1. 一种泛解酸、泛酸、泛醇或者其盐的制备方法，其特征在于，包括将底物进行微生物发酵步骤，其中，所述底物包括 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其中，所述微生物选自细菌或真菌；可选地，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、酵母或链霉菌；可选地，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)；可选地，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠杆菌；可选地，所述微生物选自重组大肠杆菌，所述重组大肠杆菌含有表达还原酶的外源基因，其中所述还原酶包括 YqhD、YqhE、DkgA、AdhE、yihU、AdH1、ADH2、ADH5 或 ADH6。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备方法，其中，将所述 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸进行发酵的酶是能把醛类转化成醇类的还原酶；

可选地，所述还原酶包括但不限于野生或者基因工程改造过的 YqhD、YqhE、DkgA、AdhE、yihU、AdH1、ADH2、ADH5 或 ADH6；

可选地，所述转化是利用所述还原酶在细菌或真菌体内完成。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的制备方法，其中，所述发酵温度为 20-90 °C；可选地，所述发酵温度为大约 30°C-65°C；可选地，所述发酵温度为大约 30-35°C。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的制备方法，其中，所述 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸是经乙醛酸与异丁醛缩合制得的；可选地，所述底物还包括 β -丙氨酸；

可选地，发酵采用碳酸钙、氢氧化钙、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、碳酸钾或氢氧化钾调节 pH，可选地，所述盐选自泛酸钙、泛酸钾、泛酸钠或泛酸铵。

6. 一种泛酸的制备方法，其特征在于，将权利要求 1-5 任一项制备方法得到的泛解酸与 β -丙氨酸进行化学反应得到；可选地，所述泛酸为 D-泛酸。

7. 一种泛酸或其盐的制备方法，其特征在于，包括将底物进行微生物发酵转化步骤，其中，所述底物包括 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸和 β -丙氨酸；可选地，所述泛酸为 D-泛酸；可选地，发酵采用碳酸钙、氢氧化钙、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、碳酸钾或氢氧化钾调节 pH，可选地，所述盐选自泛酸钙、泛酸钾、泛酸钠或泛酸铵。

8. 根据权利要求 7 所述的制备方法，其中，所述微生物选自细菌或真菌；可选地，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、酵母或链霉菌；可选地，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)；可选地，所述微

生物选自野生或基因工程改造过的大肠杆菌；可选地，所述微生物选自重组大肠杆菌，所述重组大肠杆菌含有表达还原酶的外源基因，其中还原酶包括 YqhD、YqhE、DkgA、AdhE、yihU、AdH1、ADH2、ADH5 或 ADH6。

5 9. 根据权利要求 7 所述的制备方法，其中，将所述 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸进行发酵的酶是能把醛类转化成醇类的还原酶；

可选地，所述还原酶包括但不限于野生或者基因工程改造过的 YqhD、YqhE、DkgA、AdhE、yihU、AdH1、ADH2、ADH5 或 ADH6；

可选地，所述转化是利用所述还原酶在细菌或真菌体内完成。

10 10. 根据权利要求 7-9 任一项所述的制备方法，其中，所述发酵温度为 20-90 °C；可选地，所述发酵温度为大约 30°C-65°C；可选地，所述发酵温度为大约 30-35°C。

11. 根据权利要求 7-10 任一项所述的制备方法，其中，所述 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸是经乙醛酸与异丁醛缩合制得的。

12. 一种泛醇的制备方法，其特征在于，将权利要求 1-5 任一项制备方法得到的泛解酸与 β -丙氨醇进行化学反应得到；可选地，所述泛醇为 D-泛醇。

15 13. 一种泛醇的制备方法，其特征在于，包括将底物进行微生物发酵转化步骤，其中，所述底物包括 2-羟基-3,3-二甲基-4-醛基丁酸和 β -丙氨醇；可选地，所述泛醇为 D-泛醇。

14. 根据权利要求 13 所述的制备方法，其中，所述微生物选自细菌或真菌；可选地，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、酵母或链霉菌；可选地，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)；可选地，所述微生物选自野生或基因工程改造过的大肠杆菌；可选地，所述微生物选自重组大肠杆菌，所述重组大肠杆菌含有表达还原酶的外源基因，其中还原酶包括 YqhD、YqhE、DkgA、AdhE、yihU、
20 AdH1、ADH2、ADH5 或 ADH6。
25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/102698

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/42(2006.01)i; C12P 13/02(2006.01)i; C12P 13/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CNKI, 百度学术, 泛酸 维生素B5, 泛解酸, 泛醇, 发酵, 丁酸, 丙氨酸, 发酵, 细菌, 真菌, 酵母, 链霉菌, 还原酶, Pantothenic acid, pahthenol, butyrate, alanine, ferment, bacteria, fungus, yeast, mould, reductase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1420931 A (BASF AG) 28 May 2003 (2003-05-28) claims 1-6, 56-58	1-14
X	CN 1095105 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 16 November 1994 (1994-11-16) Claims 1-6	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 September 2021

Date of mailing of the international search report

26 September 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/102698

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1420931	A	28 May 2003	HU	0202705	A2	28 December 2002
				MX	PA02003017	A	06 September 2004
				KR	20020092912	A	12 December 2002
				HU	0202705	A3	28 February 2011
				IL	148786	D0	12 September 2002
				PL	356566	A1	28 June 2004
				AU	7708700	A	24 April 2001
				JP	2003527828	A	24 September 2003
				WO	0121772	A9	05 December 2002
				JP	5392957	B2	22 January 2014
				NO	20021382	D0	20 March 2002
				BR	PI0014115	B1	05 May 2015
				EP	2163629	A3	02 June 2010
				EP	1214420	A2	19 June 2002
				TR	200200751	T2	23 August 2004
				EP	2163629	A2	17 March 2010
				SK	5222002	A3	04 March 2003
				CZ	20021013	A3	11 December 2002
				HU	230509	B1	28 September 2016
				NO	20021382	L	16 May 2002
				BR	0014115	A	21 May 2002
				WO	0121772	A2	29 March 2001
				NO	20021382	A	16 May 2002
				WO	0121772	A3	07 March 2002
				CA	2385497	A1	29 March 2001
				EP	1214420	B1	23 March 2016
				EP	2163629	B1	08 March 2017
				US	2005089973	A1	28 April 2005
				IN	222499B	B	21 November 2008
				ZA	200203116	A	25 June 2003
CN	1095105	A	16 November 1994	KR	100282278	B1	15 February 2001
				AT	254174	T	15 November 2003
				CN	1114697	C	16 July 2003
				CN	1097039	C	25 December 2002
				DE	69333295	T2	26 August 2004
				CN	1225358	A	11 August 1999
				CN	1225394	A	11 August 1999
				EP	0590857	A3	27 September 1995
				EP	0590857	A2	06 April 1994
				JP	H06261772	A	20 September 1994
				CN	1225392	A	11 August 1999
				US	5518906	A	21 May 1996
				CN	100392069	C	04 June 2008
				JP	3710497	B2	26 October 2005
				DE	69333295	D1	18 December 2003
				CN	1056192	C	06 September 2000
				CN	1124344	C	15 October 2003
				EP	0590857	B1	12 November 2003
				DK	0590857	T3	29 March 2004
				KR	940007186	A	26 April 1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/102698

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CN 1225388 A	11 August 1999
		EP 0590857B1 B1	12 November 2003

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/102698

A. 主题的分类 C12P 7/42 (2006.01) i; C12P 13/02 (2006.01) i; C12P 13/04 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类											
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) C12P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CNKI, 百度学术, 泛酸 维生素B5, 泛解酸, 泛醇, 发酵, 丁酸, 丙氨酸, 发酵, 细菌, 真菌, 酵母, 链霉菌, 还原酶, Pantothenic acid, pahthenol, butyrate, alanine, ferment, bacteria, fungus, yeast, mould, reductase											
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 1420931 A (BASF公司) 2003年 5月 28日 (2003 - 05 - 28) 权利要求1-6、56-58</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1095105 A (武田药品工业株式会社) 1994年 11月 16日 (1994 - 11 - 16) 权利要求1-6</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 1420931 A (BASF公司) 2003年 5月 28日 (2003 - 05 - 28) 权利要求1-6、56-58	1-14	X	CN 1095105 A (武田药品工业株式会社) 1994年 11月 16日 (1994 - 11 - 16) 权利要求1-6	1-14
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
X	CN 1420931 A (BASF公司) 2003年 5月 28日 (2003 - 05 - 28) 权利要求1-6、56-58	1-14									
X	CN 1095105 A (武田药品工业株式会社) 1994年 11月 16日 (1994 - 11 - 16) 权利要求1-6	1-14									
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。											
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 </td> <td> “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件 </td> </tr> </table>			* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件							
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件										
国际检索实际完成的日期 2021年 9月 2日		国际检索报告邮寄日期 2021年 9月 26日									
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 汪建斌 电话号码 62411184									

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/102698

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1420931	A	2003年 5月 28日	HU	0202705	A2	2002年 12月 28日
				MX	PA02003017	A	2004年 9月 6日
				KR	20020092912	A	2002年 12月 12日
				HU	0202705	A3	2011年 2月 28日
				IL	148786	D0	2002年 9月 12日
				PL	356566	A1	2004年 6月 28日
				AU	7708700	A	2001年 4月 24日
				JP	2003527828	A	2003年 9月 24日
				WO	0121772	A9	2002年 12月 5日
				JP	5392957	B2	2014年 1月 22日
				NO	20021382	D0	2002年 3月 20日
				BR	PI0014115	B1	2015年 5月 5日
				EP	2163629	A3	2010年 6月 2日
				EP	1214420	A2	2002年 6月 19日
				TR	200200751	T2	2004年 8月 23日
				EP	2163629	A2	2010年 3月 17日
				SK	5222002	A3	2003年 3月 4日
				CZ	20021013	A3	2002年 12月 11日
				HU	230509	B1	2016年 9月 28日
				NO	20021382	L	2002年 5月 16日
				BR	0014115	A	2002年 5月 21日
				WO	0121772	A2	2001年 3月 29日
				NO	20021382	A	2002年 5月 16日
				WO	0121772	A3	2002年 3月 7日
				CA	2385497	A1	2001年 3月 29日
				EP	1214420	B1	2016年 3月 23日
				EP	2163629	B1	2017年 3月 8日
				US	2005089973	A1	2005年 4月 28日
				IN	222499B	B	2008年 11月 21日
				ZA	200203116	A	2003年 6月 25日
CN	1095105	A	1994年 11月 16日	KR	100282278	B1	2001年 2月 15日
				AT	254174	T	2003年 11月 15日
				CN	1114697	C	2003年 7月 16日
				CN	1097039	C	2002年 12月 25日
				DE	69333295	T2	2004年 8月 26日
				CN	1225358	A	1999年 8月 11日
				CN	1225394	A	1999年 8月 11日
				EP	0590857	A3	1995年 9月 27日
				EP	0590857	A2	1994年 4月 6日
				JP	H06261772	A	1994年 9月 20日
				CN	1225392	A	1999年 8月 11日
				US	5518906	A	1996年 5月 21日
				CN	100392069	C	2008年 6月 4日
				JP	3710497	B2	2005年 10月 26日
				DE	69333295	D1	2003年 12月 18日
				CN	1056192	C	2000年 9月 6日
				CN	1124344	C	2003年 10月 15日
				EP	0590857	B1	2003年 11月 12日
				DK	0590857	T3	2004年 3月 29日
				KR	940007186	A	1994年 4月 26日

国际申请号
PCT/CN2021/102698

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CN 1225388 A	1999年 8月 11日
		EP 0590857B1 B1	2003年 11月 12日