

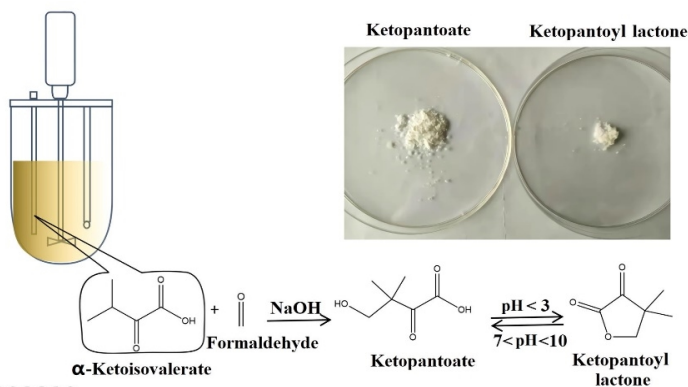
Ketopantoate production from glucose by combining biological and chemical steps

Yao YAO^{1,2}, Xiyang LU¹, Lin SHU^{1,2}, Qinghui WANG¹, Shaoqi SUN¹, Jian HAO^{1,2*}

1. Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: D-pantothenic acid (vitamin B5) is an essential vitamin to animals and has large markets in the feed, cosmetics, and pharmaceutical industries. The biochemical role of D-pantothenic acid in all organisms is to form the core of the structure of coenzyme A. Biosynthesis of coenzyme A from pantothenate occurs in all organisms, while the synthesis of D-pantothenic acid is absent from animals. Thus D-pantothenic acid is an essential nutrient to animals.



Ketopantoate is an intermediate of pantothenate biosynthesis pathway. Ketopantoate can be stereoselectivity converted to D-pantoic acid and further used for D-pantothenic acid production. However, the economic production of ketopantoate is a bottleneck of D-pantothenic acid production from ketopantoate. Hence, this study provided a novel method for synthesis of ketopantoate by aldol reaction of α -ketoisovalerate and formaldehyde, and α -ketoisovalerate was produced from fermentation with glucose as the raw material. 25.2 g/L α -ketoisovalerate was produced by an engineering *Klebsiella pneumoniae* strain with glucose as the main carbon source. 19.9 g/L Ketopantoate was synthesized from formaldehyde and α -ketoisovalerate by an aldol reaction at basic conditions. The reaction parameters of reaction were optimized and a conversion ratio of 83.5% was obtained at reaction conditions of pH 13 and 45°C. The ketopantoate in the solution was converted to ketopantoyl lactone at acidic conditions of pH < 3. Ketopantoyl lactone was extracted to isobutanol with an extraction rate of 50.9%. The organic phase was decolourized, and ketopantoyl lactone crystal was obtained after concentration. Ketopantoyl lactone was converted back to ketopantoate in an aqueous solution in the pH range of 7~10, and ketopantoate crystal was obtained after concentration. Ketopantoate production from glucose via α -ketoisovalerate as an intermediate was set up, which suggested a novel and competitive technical route to produce ketopantoate. The whole processes were combined biological fermentation and chemical reactions and had a high conversion ratio. This method adopted renewable and cheap original materials rather than highly toxic raw materials. The optimal temperature of the reaction was 45°C, which was in mild conditions. Overall, a novel and promising method for ketopantoate and ketopantoyl lactone production was provided.

Key words: ketopantoate; α -ketoisovalerate; aldol reaction; *Klebsiella pneumoniae*

收稿: 2021-01-30, 修回: 2021-03-19, 网络发表: 2021-05-18; Received: 2021-01-30, Revised: 2021-03-19, Published online: 2021-05-18

基金项目: 上海市自然科学基金(编号: 19ZR1463600); 国家重大研发计划(编号: 2019YFE0196900; 2017YFE0112700)

作者简介: 姚尧(1996-), 女, 陕西省咸阳市人, 硕士研究生, 生物工程专业, E-mail: 13260189106@163.com; 郝健, 通讯联系人, E-mail: haoj@sari.ac.cn.

引用格式: 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. 过程工程学报, 2022, 22(1): 97-107.

Yao Y, Lu X Y, Shu L, et al. Ketopantoate production from glucose by combining biological and chemical steps (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2022, 22(1): 97-107, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.221036.

以葡萄糖为原料结合生物发酵与化学合成制备酮泛解酸

姚尧^{1,2}, 卢希阳¹, 舒琳^{1,2}, 王卿惠¹, 孙少琦¹, 郝健^{1,2*}

1. 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: D-泛酸(维生素B5)是一种重要的维生素,在饲料、化妆品和制药行业均有广阔的市场。酮泛解酸是泛酸生物合成途径的中间体,易内酯化为酮基泛解酸内酯,后者可立体选择性地转化为D-泛解酸,并进一步用于D-泛酸的生产。本工作提供了一种采用 α -酮基异戊酸与甲醛经羟醛反应合成酮泛解酸的新方法。其中,反应物 α -酮基异戊酸可由葡萄糖原料经发酵法生产。结果表明,以葡萄糖为碳源,经克雷伯氏肺炎杆菌发酵能高水平生产D-泛酸生物合成途径的关键前体— α -酮基异戊酸。采用商品 α -酮基异戊酸开发一种新型的酮泛解酸合成方法;分析合成反应机理,确定总反应级数为1.87;经条件优化确定酮泛解酸合成反应的最佳pH=13,最佳温度为45℃,此条件下酮泛解酸转化率达83.5%。调节酮泛解酸溶液pH至强酸性,有助于其内酯化合成酮基泛解酸内酯。之后采用前述优化的方法,由流加发酵制备的25.2 g/L α -酮基异戊酸合成酮泛解酸19.9 g/L。最后通过异丁醇萃取、活性炭脱色、浓缩结晶方法进行产物提纯,调节酮基泛解酸内酯溶液pH在7~10范围内可使其开环转化回酮泛解酸。最终得到酮泛解酸及其内酯的纯品。本研究建立了以葡萄糖为原料通过 α -酮基异戊酸中间体生产酮泛解酸的方法。该方法结合生物发酵和化学合成过程,采用廉价原料,具有绿色高效的特点,有望用于工业化生产泛酸。

关键词: 酮泛解酸; α -酮基异戊酸; 羟醛缩合; 克雷伯氏肺炎杆菌

中图分类号: TQ924

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2022)01-0097-11

1 前言

D-泛酸(维生素B5)是一种水溶性维生素,应用于制药、食品、化妆品、饲料等行业,具有广阔的市场^[1]。D-泛酸是辅酶A合成的必须前体,而多数动物体内不能合成D-泛酸^[2]。因此,D-泛酸是动物必需的外源营养物质。

工业上D-泛酸的生产以异丁醛、甲醛、氢氰酸和 β -丙氨酸为初始原料,如图1所示。首先异丁醛和甲醛缩合形成2,2-二甲基-3-羟基丙醛,该产物与氢氰酸发生亲核加成反应形成氰醇。氰醇经过水解和内酯化以形成DL-泛解酸内酯的外消旋混合物。然后采用立体选择性水解酶将混合物中的D-泛解酸内酯水解成D-泛解酸,将其从外消旋混合物中分离出来。D-泛解酸被

转化为D-泛解酸内酯,最后与 β -丙氨酸合成D-泛酸^[3,4]。该方法效率高,但生产过程中不可避免地引入剧毒的氢氰酸。

D-泛解酸内酯也可以通过立体选择性还原酮基泛解酸内酯获得。已报道许多微生物都具有酮基泛解酸内酯还原酶,如面包酵母^[5,6]、嗜麦芽嗜单胞菌^[7]、微小假单胞菌、金黄色葡萄球菌^[8]、黑曲霉和副念珠菌^[9]等。该酶可以特异催化酮基泛解酸内酯形成D-泛解酸内酯。这些反应中使用的酮基泛解酸内酯一般通过化学或生物氧化DL-泛解酸内酯获得^[10],而DL-泛解酸内酯的合成如前所述,其中复杂繁琐的反应过程和氢氰酸的引入使此方法不具备竞争力。因此,需要开发一种绿色高效的酮泛解酸及其内酯的生产方法,以优化人体必需维生素B5(D-泛酸)的生产。

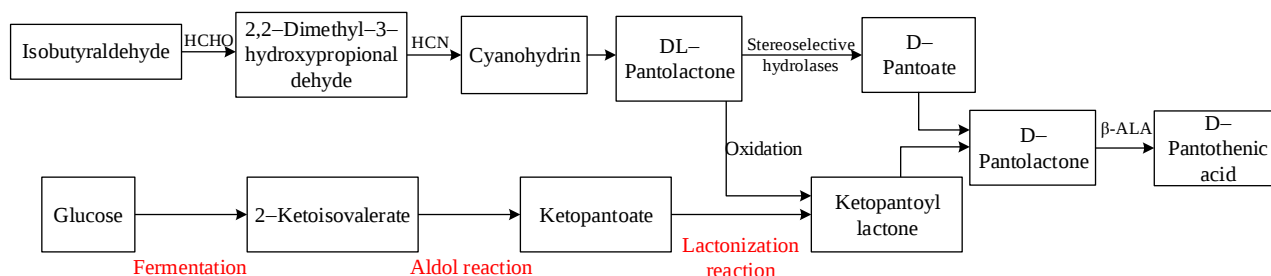


图1 D-泛酸合成工艺示意图

Fig.1 Diagram of D-pantothenic acid synthesis process

D-泛酸生物合成途径从 α -酮基异戊酸开始,经酮泛解酸羟甲基转移酶(PanB)催化形成酮泛解酸,后者和 β -丙氨酸在泛酸合成酶(PanC)的催化下合成泛酸。已报道在大肠杆菌或谷氨酸棒杆菌中通过高水平表达该途径的关键酶,成功构建了D-泛酸生产菌株^[11-14]。克雷伯氏肺炎菌是一种重要的工业微生物,已用于多种化学品的生产,如2,3-丁二醇^[15],1,3-丙二醇^[16,17]和3-羟基丙酸^[17]。课题组前期研究中通过代谢工程构建了一株乙酰乳酸脱羧酶BudA、乳酸脱氢酶LdhA和吡哆-3-丙酮酸脱羧酶IpdC三基因敲除菌株,该菌株能够高水平地产生D-泛酸生物合成的前体 α -酮基异戊酸^[18]。但发酵过程中未检测到该菌株中D-泛酸或酮泛解酸的生成。由于该菌株能以葡萄糖为原料高效合成 α -酮基异戊酸。本工作提出了利用 α -酮基异戊酸中间体,经羟醛反应合成酮泛解酸,经内酯化反应合成酮基泛解酸内酯的方法(图1红色标记所示),这是一种全新的合成方法。

2 实验

2.1 实验材料及试剂

葡萄糖(分析纯)、氯化钠(优级纯)、 α -酮基异戊酸钙(优级纯)、甲醛(分析纯)、氢氧化钠(优级纯)、三乙胺(分析纯)、氨水(分析纯)、磷酸氢二钠(优级纯)、磷酸二氢铵(优级纯)、正己烷(分析纯)、正丁醇(分析纯)、异戊酸(分析纯)、异戊醇(分析纯)、异丁醇(分析纯)、三氯甲烷(分析纯)、二氯甲烷(分析纯)、活性炭(优级纯)、玉米浆粉(生化试剂)均购于上海国药集团化学试剂有限公司,酵母提取物(生化试剂,北京希凯创新科技有限公司),胰蛋白胨(生化试剂,生工生物工程有限公司),乙腈(色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司)。

2.2 实验设备及分析仪器

Biostat A Plus 5 L发酵罐(德国 Sartorius),DK-8D 三孔电热恒温水槽(上海飞域实业国际贸易有限公司),IKA RV10 旋转蒸发仪(上海人和科学仪器有限公司),SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),Centrifuge5424 小型离心机(Eppendorf),ZHJH-C1115C 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司),KQ5200 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),20AVP 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU)。

2.3 酮泛解酸制备方法

2.3.1 发酵合成中间产物 α -酮基异戊酸

α -酮基异戊酸的制备通过葡萄糖为碳源经克雷伯氏肺炎菌株 *Kp* Δ budA Δ ldhA Δ ipdC 发酵获得。首先进行发酵种子培养:将装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 烧瓶

置于摇床中 37℃ 200 r/min 震荡培养过夜。然后将菌液以 1% 的接种量接种到装有 3 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐内。自动控制发酵液 pH 为 7,空气进样量和转速分别为 2 L/min 和 300 r/min。其中,发酵培养基成分为 100 g/L 葡萄糖、5 g/L 酵母提取物、4 g/L 玉米浆、5 g/L 硫酸铵、3 g/L 乙酸钠、0.4 g/L 氯化钾和 0.1 g/L 硫酸镁。所得发酵液 12 000 r/min 离心 5 min 去除细胞和其他不溶性杂质,上清液用于酮泛解酸合成实验。

2.3.2 羟醛反应由 α -酮基异戊酸合成酮泛解酸

将 α -酮基异戊酸钙配制成溶液,加入磷酸氢二钠离心后得到 α -酮基异戊酸钠溶液,该 α -酮基异戊酸钠溶液用于酮泛解酸的合成实验。

少量实验以 2 mL 离心管用作反应器,置于水浴锅中恒温。预热 10 min 后,将 0.5 mL 甲醛添加到 1 mL α -酮基异戊酸钠溶液(25 g/L)中开始反应。反应期间及时加入碱溶液恒定反应体系的 pH,定期取样进行分析。大量制备实验使用 150 mL 离心管,采用优化后的反应条件制备酮泛解酸。

反应混合产物中分离提取酮泛解酸:反应后得到的混合物溶液于压力 0.07 MPa、80℃ 和 90 r/min 条件下进行真空浓缩,将溶液浓缩至约其初始体积的 20%,然后将该溶液于室温下放置过夜。

2.4 酮泛解酸的内酯化和开环化方法

2.4.1 酮基泛解酸内酯化

酮泛解酸于酸性条件下可内酯化成酮基泛解酸内酯,通风橱内加浓盐酸调节酮泛解酸溶液 pH 至 1,置于 30℃ 水浴锅内酯化 30 min。

2.4.2 酮基泛解酸内酯萃取实验

少量实验以 2 mL 离心管用作萃取容器,加入 500 mL 酮基泛解酸内酯化后溶液和 500 mL 萃取剂,震荡混合均匀后于室温下静置 10 min。

2.4.3 酮基泛解酸内酯晶体制备

萃取后的酮基泛解酸内酯溶液加入 0.5wt% 活性炭脱色 12 h,抽滤去除活性炭,重复 3 次。脱色后的液体于压力 0.07 MPa、80℃ 和 90 r/min 下减压浓缩至仅剩余初始体积的 10%,静置过夜后,得酮基泛解酸内酯晶体。

2.4.4 酮基泛解酸内酯开环

制备的酮基泛解酸内酯粉末溶于水后,加 NaOH 调节 pH 至 10.0,置于 30℃ 水浴锅开环化 30 min。即可将内酯开环为酮泛解酸。

2.5 表征和分析方法

2.5.1 核磁共振光谱分析

将实验中获得酮泛解酸和酮基泛解酸内酯溶于

D₂O 中,使用布鲁克波谱仪,进行¹H和¹³C核磁共振(NMR)光谱分析。

2.5.2 高效液相色谱分析

用配有SPD-M20A二极管阵列检测器的高效液相色谱岛津系统对反应混合物中的各化合物进行定量。使用安捷伦ZORBAX SB-Aq色谱柱,色谱柱温度设置为30℃。流动相为pH=3.0的0.5 mol/L磷酸二氢铵/乙腈(95/5, v/v);流速为0.5 mL/min;检测波长为210 nm。

各物质出峰时间:酮泛解酸为7.3 min, α-酮基异戊酸为8.8 min, 酮基泛解酸内酯为14.5 min, 副产物-1为

5.6 min, 副产物-2为7.8 min。液相图谱如图2所示。

副产物定量方法:

副产物-1:易结晶析出而提纯,将其晶体视作标准品,绘制副产物-1的标准曲线;

副产物-2:因TEA催化时,副产物大量生成,故持续过量添加TEA,直至酮泛解酸产量很小,甚至可以忽略不计。将此时得到的溶液视作仅由副产物-1和副产物-2组成的混合物,利用副产物-1的标准曲线计算其生成量,采用差减法计算余下的副产物-2的生成量,绘制副产物-2标准曲线,以副产物-1和副产物-2的标准曲线定量副产物总浓度。

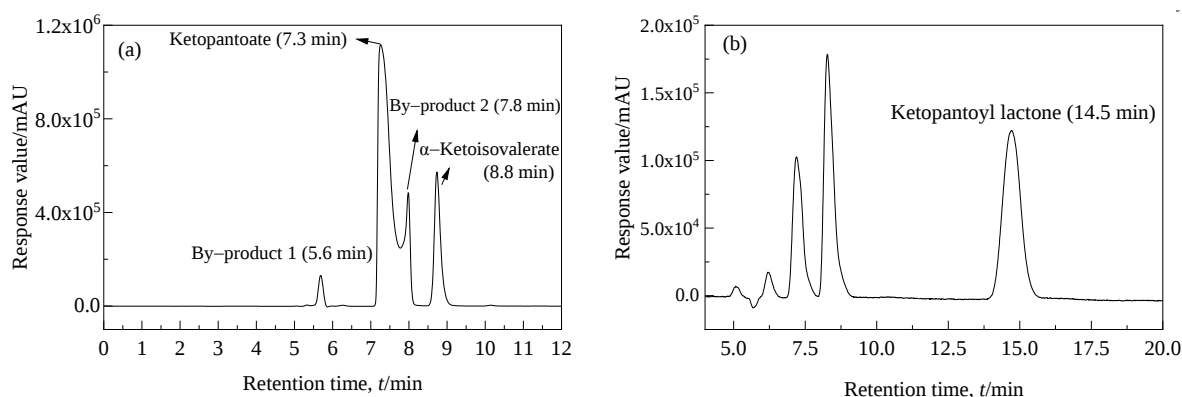


图2 各物质保留时间和液相图谱
Fig.2 Retention time and HPLC spectrum of each substance

3 结果与讨论

3.1 以葡萄糖原料经补料发酵制备 α-酮基异戊酸

本课题组前期研究在克雷伯氏肺炎杆菌中构建了乙酰乳酸脱羧酶 BudA、乳酸脱氢酶 LdhA 和吡嗪-3-丙酮酸脱羧酶 IpdC 三基因敲除菌株,该菌株能够高水平地生产 α-酮基异戊酸^[18],后者是 D-泛酸生物合成的关键前体,故本实验首先验证能否通过生物发酵克雷伯氏肺炎杆菌 *Kp ΔbudAΔldhAΔipdC* 生产 D-泛酸。发酵结果如图3所示。其中 α-酮基异戊酸生产水平较高,但未检测到该菌株中 D-泛酸或酮泛解酸的生成。

由图3可知,发酵初期菌体生长速度较快,但基本不产生 α-酮基异戊酸,发酵6 h后 α-酮基异戊酸开始合成;随着葡萄糖被消耗, α-酮基异戊酸的浓度呈线性增长,当发酵罐中葡萄糖浓度小于20.0 g/L补加葡萄糖。发酵后期菌体生长速度放缓,菌体浓度呈下降趋势,95 h后基本不再消耗葡萄糖,最终合成25.2 g/L的 α-酮基异戊酸,由葡萄糖合成 α-酮基异戊酸的转化率为14.8%,达到理论转化率的22.9% (α-酮基异戊酸转化率=α-酮

基异戊酸的产量/葡萄糖总消耗量)。尽管未检测到 D-泛酸或酮泛解酸的生成,但其中较高的 α-酮基异戊酸产量为进一步开发体外化学反应法合成酮泛解酸提供了可能性。

发酵液中还有乳酸、琥珀酸、甲酸、乙酸、乙醇等副产物,其中乙酸和甲酸产量最高,但制备酮泛解酸的反应过程中,外加的反应物甲醛不与发酵液中含羧基的甲酸和乙酸反应,故副产物对酮基泛解酸的合成反应影响不大。

3.2 α-酮基异戊酸钙和甲醛合成酮泛解酸

为探究 α-酮基异戊酸能否经羟醛反应合成酮泛解酸,首先采用购买的 α-酮基异戊酸钙标准品进行验证。但若直接利用 α-酮基异戊酸钙进行反应,反应过程中会生成 Ca(OH)₂ 沉淀。因此,将 α-酮基异戊酸钙溶液中的钙离子置换为钠盐溶液再进行反应,方法见2.2.2。

调节 α-酮基异戊酸钠溶液的 pH 至13,并向该溶液中添加甲醛。在60℃下水浴处理1 h后,检测样品。液相检测结果显示 α-酮基异戊酸逐渐被消耗掉,且在液相谱图中保留时间7.3 min处出现了酮泛解酸化合物的

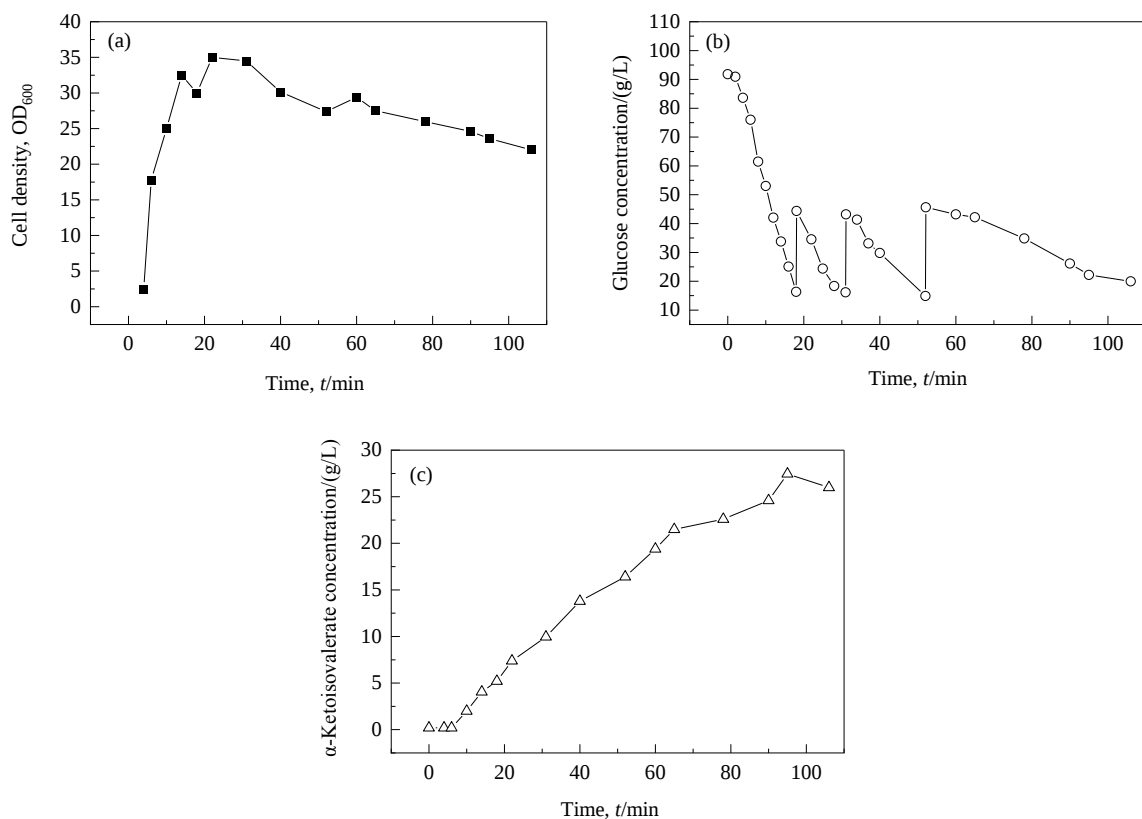


图3 *Kp ΔbudAΔldhAΔipdC*流加发酵制备α-酮基异戊酸 (a) 菌体生长曲线; (b) 葡萄糖消耗曲线; (c) α-酮基异戊酸合成曲线
 Fig.3 α-Ketoisovalerate produced by *Kp ΔbudAΔldhAΔipdC* in fed-batch fermentation

峰。反应产物经过浓缩结晶,采用核磁共振(NMR)对样品进行结构检测,结果如图4和表1所示。

样品的¹H NMR谱图和文献[18]报道中利用酶促反应得到的酮泛解酸样品相似,但是该文献中没有列出化学位移数据。采用ChemDraw预测酮泛解酸内各C和H

的化学位移见表1。由表1可以看出,样品化学位移的实测值和酮泛解酸的预测值均比较接近。确认了反应产物的结构为酮泛解酸。因此,酮泛解酸可以由α-酮基异戊酸和甲醛经羟醛缩合反应产生。

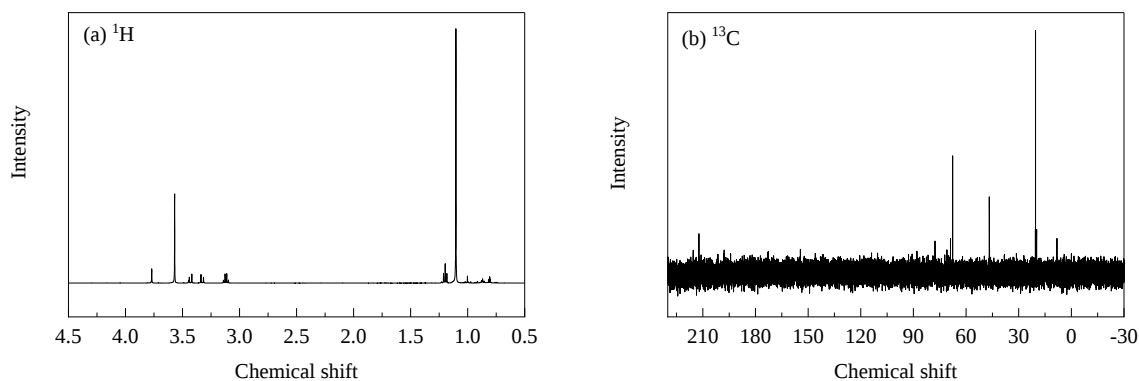
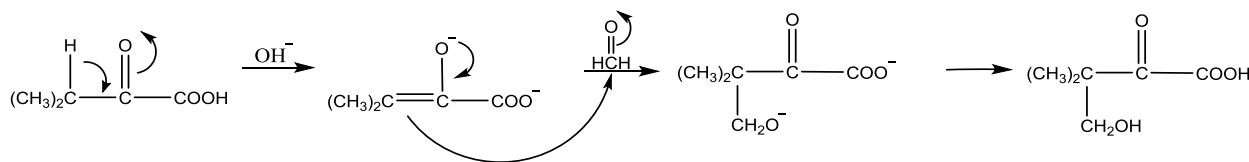


图4 反应产物核磁共振谱图
 Fig.4 NMR analysis of the reaction product

表1 反应产物核磁共振 ^1H 和 ^{13}C 谱的化学位移Table 1 ^1H and ^{13}C NMR chemical shift for reaction product

	^1H		^{13}C				
	CH_3	CH_2	CH_3	C	CH_2OH	COOH	CO
Chemical shift (Measured)	1.1	3.5	20.4	46.7	67.6	154.4	212.2
Chemical shift (Predictive)	1.2	3.7	19.7	47	69.9	173.8	203.3

图5 α -酮基异戊酸与甲醛反应形成酮泛解酸反应机理Fig.5 Reaction mechanism of ketopantoate synthesis from α -ketoisovalerate and formaldehyde

羟醛缩合反应中,羰基的 α -H首先与碱结合,转变为烯醇式负离子;然后该负离子作为亲核试剂进攻甲醛上的羰基碳原子,进行亲核加成,形成一个中间负离子(烷氧负离子);最后烷氧负离子与水作用得到 β -羟基酮。

反应级数测定:首先,在甲醛过量条件下确定 α -酮基异戊酸的反应级数,绘制不同温度(303, 318和333 K)下 α -酮基异戊酸随时间变化的曲线[图6(a)]。对曲线作切线,计算反应速率,以反应速率和对应底物浓度求对数,绘制拟合曲线[图6(b)]。同样在酮泛解酸过量条件下绘制不同温度下反应过程[图6(c)]并作对数拟合曲线[图6(d)]。

当甲醛过量时,反应在303, 318和333 K下, $\ln(-\frac{dc_{\alpha\text{-KIV}}}{dt})$ 和 $\ln c_{\alpha\text{-KIV}}$ 关系的拟合曲线分别为 $y=0.9398x-2.72812$, $y=0.91878x-2.06831$ 和 $y=0.97564x-1.55095$, 斜率(α -酮基异戊酸的级数)为0.9398, 0.91878和0.97564;截距($\ln K$)为-2.72812, -2.06831和-1.55095 [图6(b)]。反应物 α -酮基异戊酸的级数为三个拟合曲线斜率的平均值,为0.94。同理,在 α -酮基异戊酸过量情况下,确定甲醛的级数为0.93 [图6(d)],故总反应级数为1.87。

利用不同温度下的反应速率,根据阿伦尼乌斯方程计算反应活化能,以甲醛过量反应计算的反应活化能 $E_a=32.7\text{ kJ/mol}$,以 α -酮基异戊酸过量反应计算的活化能 $E_a=32.4\text{ kJ/mol}$ 。

在乙醛的自身羟醛缩合反应级数研究中,确定反应为二级反应^[21]。醋酸甲酯和甲醛反应制备丙烯酸甲酯的反应也是羟醛缩合反应。该反应在醋酸甲酯过量情况下甲醛的反应级数为1.8,反应活化能为54.2 kJ/mol,由于反应需要的能量较高,需要在330℃下进行反应^[22]。而本实验反应所需活化能较低,反应在常温下即可进行。

3.3 反应机理分析

酸催化剂或碱催化剂均可以催化羟醛缩合反应,根据机理不同划分为酸催化和碱催化两种^[19]。本反应主要涉及碱催化机理,属于碳负离子机理^[20]。反应机理如图5所示。

3.4 反应条件优化

3.4.1 反应pH的确定

溶液pH影响 α -酮基异戊酸转化为碳负离子中间体的速率,从而影响亲核加成甲醛的反应速率。选用磷酸和氢氧化钠调节反应体系的pH,并保持反应过程中pH恒定,比较不同pH条件对酮泛解酸合成的影响。结果如图7所示。由图可知,随溶液pH升高,反应速率变快。酸性(pH=3)条件下,未发生酮泛解酸合成反应;中性(pH=7)条件和弱碱性(pH=9)条件下,反应60 min分别生成1.2和3.8 g/L的酮泛解酸;当溶液pH=11时, α -酮基异戊酸的消耗和酮泛解酸的生成速率较快;强碱性(pH=13)条件下,反应进行得最快,50 min反应结束, α -酮基异戊酸向酮泛解酸转化率为83.5%。

大部分羟醛缩合反应都是在碱性条件下发生,不同原料反应的最适pH略有不同。乙醛发生自身羟醛缩合反应合成3-羟基丁醛过程中最适pH值为11.4,该条件下,反应转化率和选择性最好,副产物量最低^[21]。甲醛和丁醛缩合反应合成2,2-二羟甲基丁酸的研究中,反应最佳pH为10^[23]。这是由于两个反应的反应物均为醛,强碱性条件下,无 α -H的醛易发生Cannizzaro反应而生成副产物。而弱碱性条件下,醛的 α -H更易作为质子离去,形成碳负离子,更有利于羟醛缩合反应进行。本研究酮泛解酸的合成是由 α -酮基异戊酸转变为碳负离子, α -酮基异戊酸不发生Cannizzaro反应,因此碱性越强,越容易失去活泼氢而有利于羟醛缩合反应。

3.4.2 碱性催化剂的选择

羟醛缩合反应中最常用的碱是胺类催化剂^[24-26],如三乙胺^[27]和氨水,因为它们具有强碱性,并且反应完成后易挥发除去,有助于产物纯化。选取三乙胺(TEA)、氨水(NH_4^+OH^-)和实验室常用碱金属催化剂(NaOH),对比三种不同催化剂对酮泛解酸产率的影响,结果如图8所

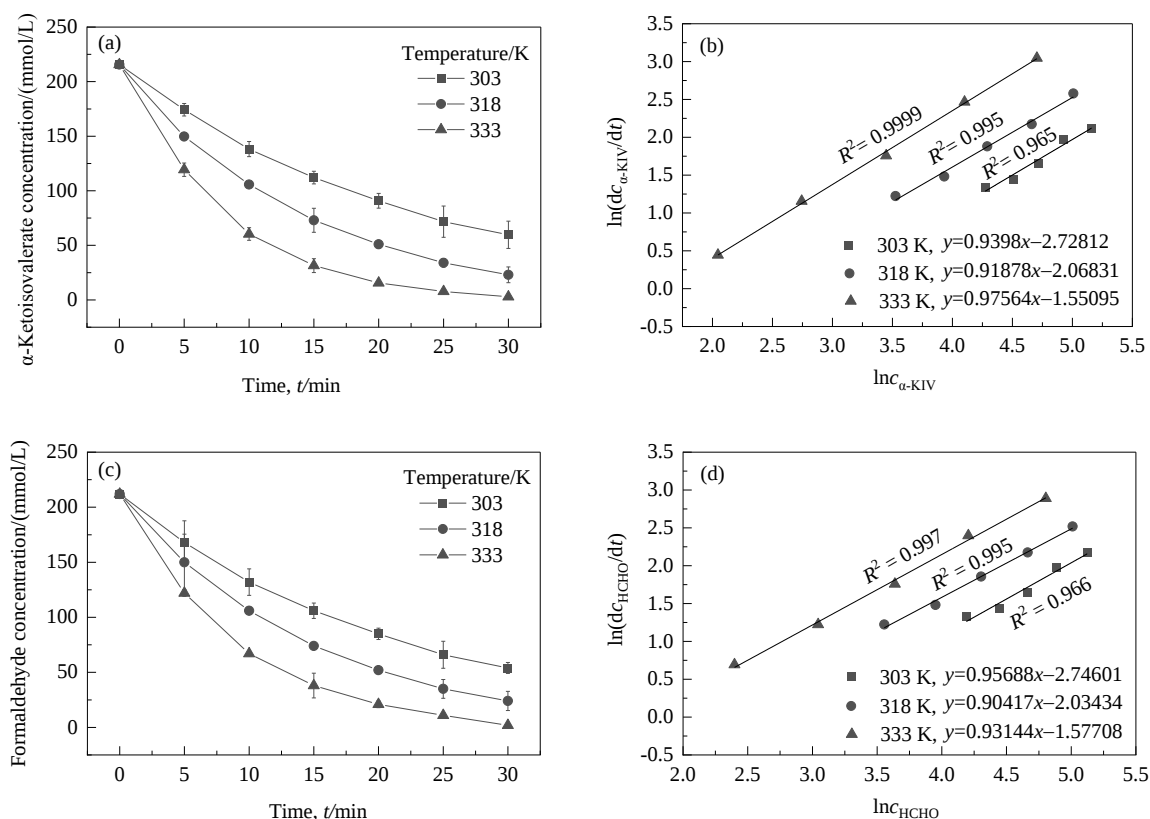


图6 酮泛解酸合成反应级数研究
Fig.6 The reaction order of ketopantoate synthesis

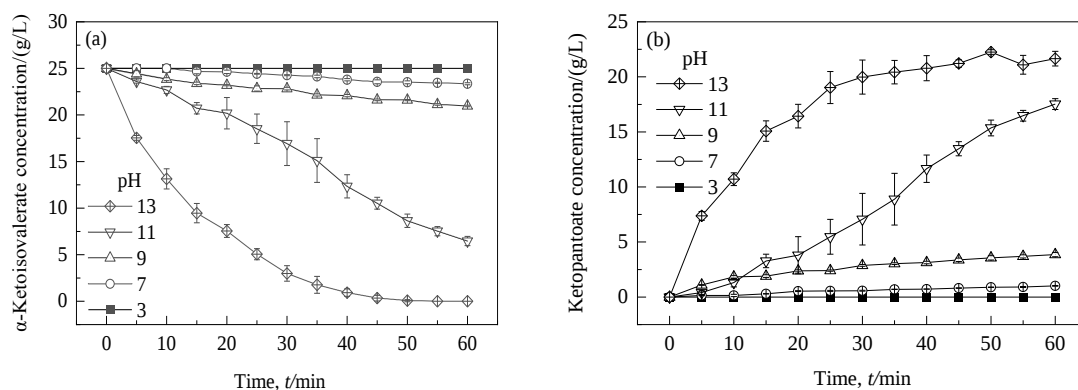


图7 不同pH下酮泛解酸合成结果
Fig.7 Synthesis results of ketone pantolytic acid at different pH

示。由图可知,三组实验中 α -酮基异戊酸的消耗速率基本相同[图8(a)]。但是不同催化剂对酮泛解酸的合成影响较大。以NaOH为催化剂时,酮泛解酸的产率最高,达83.4%;以氨水(NH_4^+OH)为催化剂时,会有未知副产物的生成,导致酮泛解酸产率下降至63.2%;以三乙胺(TEA)做反应催化剂时,酮泛解酸的产率最低,仅有44.0%。

利用三乙胺和氨水催化的反应产物经HPLC分析发现有两种副产物生成。其中副产物-1在保留时间5.6 min处出峰,副产物-2在7.8 min处出峰。保留时间5.6 min副产物低温下易结晶析出得到纯品,利用核磁测定该物质 ^1H 和 ^{13}C 谱中均只有一个峰,推测副产物-1可能是六亚甲基四胺。因为甲醛和氨发生反应生成六亚甲基四胺^[28,29],另一副产物不易分离提纯,结构有待进一步

实验鉴定。

氨类催化剂是羟醛缩合反应中常用的催化剂。在环氧丙酮与4-硝基苯甲醛的反应和 β -酮羧酸与三氟丙酮酸的脱羧羟醛缩合反应均采用氨水催化羟醛缩合反应^[25,26]。在乙醛自身羟醛缩合反应的研究中,显示以强碱(KOH, NaOH)为催化剂时短时间内转化率较高,但随反应时间延长,出现深度缩合,导致选择性降低,最终选

用 Na_2CO_3 作为催化剂^[21]。以正丙醛和甲醛合成二羟甲基丙酸实验研究中考察了氢氧化钠,碳酸钾和三乙胺做催化剂,结果显示NaOH的效果最差,三乙胺的催化效果最好^[30]。本实验对比不同催化剂对酮泛解酸的产率的影响,发现三乙胺做催化剂,会生成大量副产物,而NaOH催化反应过程中副产物最低,因此最终选用NaOH作为该反应的碱性催化剂。

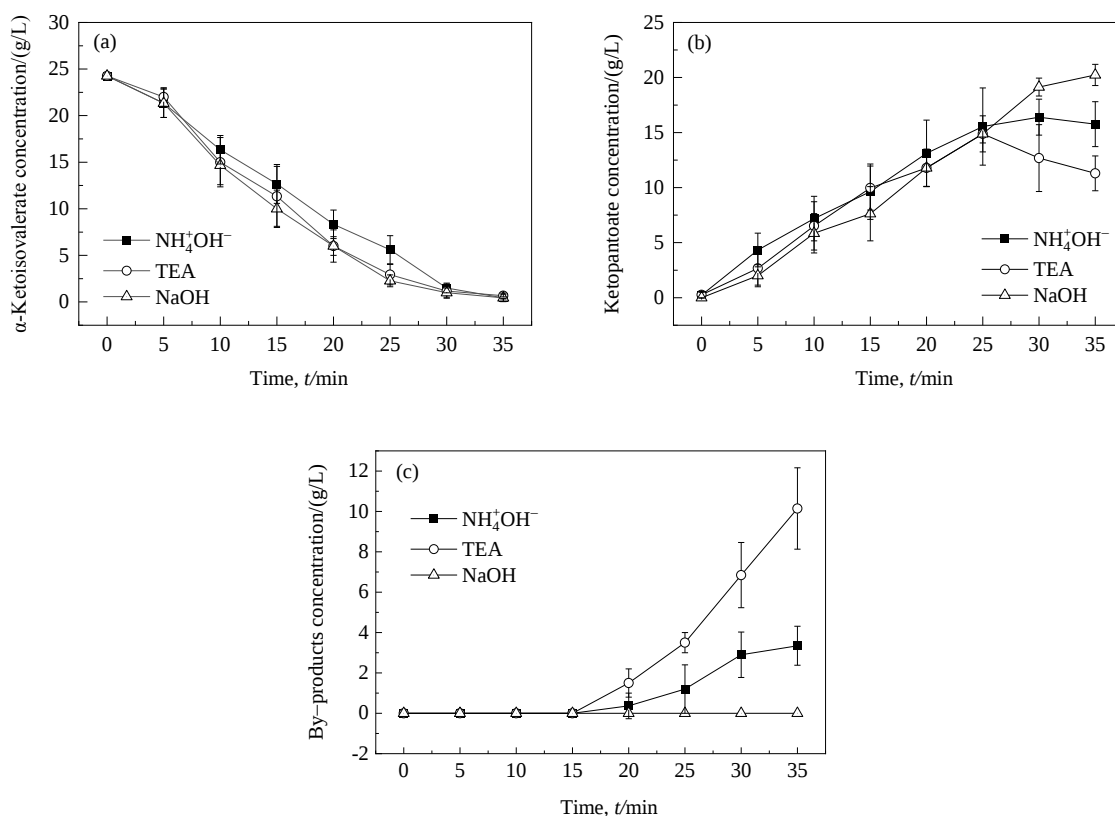


图8 不同碱性条件催化酮泛解酸合成
Fig.8 Synthesis of ketonpantoate catalyzed by different alkaline conditions

3.4.3 温度的选择

本研究进一步考察不同反应温度对反应的影响。由于羟醛缩合反应条件相对温和,选取比较温和的温度条件(30, 45, 60和75℃),进行实验,反应过程中各物质的变化如图9所示。由图9(a)可知, α -酮基异戊酸的反应速率随温度的升高而加快,其中30℃时反应最慢;而在高于30℃的温度条件下,30 min内 α -酮基异戊酸均已基本反应完全(余量<5 g)。60和75℃条件下,前5 min反应速率比较快,之后反应速率随反应物 α -酮基异戊酸量的减少逐渐放缓。75℃下反应速率最快,15 min左右 α -酮基异戊酸基本已经完全反应,酮泛解酸也达到最高浓度,但之后随时间增加酮泛解酸呈现先增高后降低的趋势。60℃下 α -酮基异戊酸的反应速度较快,且

酮泛解酸的生成率最高,25 min后酮泛解酸的产量反而略有下降。45与60℃条件下,酮泛解酸的产率相差不大(79.5%和81.2%)。因此,45和60℃温度条件均适合酮泛解酸的合成。

在甲醛与丁醛合成2,2-羟甲基丁酸的研究中,30℃是最佳反应温度,在高温下易发生许多副反应,如生成 α -乙基丙烯醛的脱水反应及Cannizzaro反应^[23]。本实验酮泛解酸合成过程中没有烯醛类副产物的生成,因此不会发生这些与醛基产物相关的副反应。乙醛缩合反应的研究中35℃条件下获得较高的转化率^[21]。在利用正丙醛合成二羟甲基丙酸的研究中,也确定35℃是最佳温度。在该研究中,随反应温度升高,正丙醛的转化率先增高后降低,这是由于温度过高会发生歧化反应,影

响缩合反应进行^[30]。

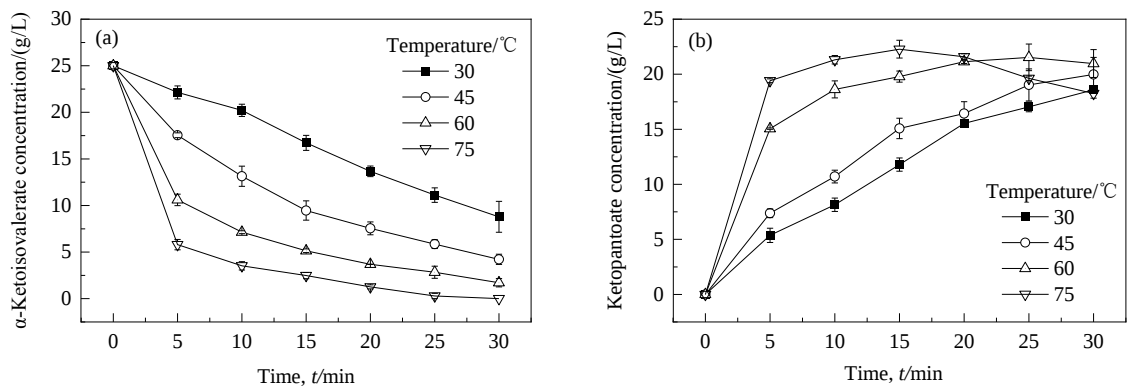


图9 反应温度对酮泛解酸合成的影响
Fig.9 The effects of reaction temperature on ketopantoate synthesis

3.5 酮基泛解酸内酯的制备

酮泛解酸可于强酸性条件下经内酯化反应合成酮基泛解酸内酯。由于前述酮泛解酸的合成发生在强碱性条件下，反应后的体系为强碱性，不能发生内酯化反应。故通过调节反应产物pH，将酮泛解酸转化成酮基泛解酸内酯，采用HPLC检测。实验结果显示，当溶液的pH>3时不发生内酯化反应，只有在pH<3时发生内酯化反应，且pH<1时内酯化效果最好，转化率达90.3%。

3.6 α-酮基异戊酸发酵液制备酮泛解酸

已确定酮泛解酸和酮泛解酸内酯可由商品α-酮基异戊酸原料合成，接下来验证前述补料发酵法生产的α-酮基异戊酸能否进一步用于酮泛解酸的制备。将发酵液离心除去细胞和其他不溶性杂质，采用优化的最佳条件(NaOH调pH至13,45℃下)与甲醛进行反应。反应结果如图10所示。由图可知，在优化反应条件下，25.2 g/L α-酮基异戊酸能合成酮泛解酸19.9 g/L，反应转化率达78.9%。表明利用α-酮基异戊酸发酵液制备酮泛解酸与采用商品α-酮基异戊酸制备酮泛解酸结果相似。

3.7 酮泛解酸和酮基泛解酸内酯产物提纯

商品α-酮基异戊酸制备的酮泛解酸产物成分简单，可直接通过浓缩结晶得到酮泛解酸晶体。但经发酵产α-酮基异戊酸过程中还有乳酸、甲酸、乙酸、乙醇等副产物的产生，成分复杂，制备的酮泛解酸不能直接通过浓缩结晶获得。需先调节pH至强酸性，将其转化为酮基泛解酸内酯，再通过萃取分离出极性较小的酮基泛解酸内酯产品。选用不同有机溶剂萃取分离酮基泛解酸内酯，萃取结果见表2。由表2可知，异丁醇和二氯甲烷可以有效萃取水溶液中的酮基泛解酸内酯，萃取收率

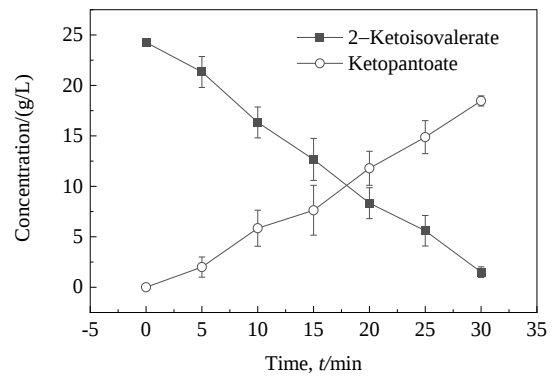


图10 α-酮基异戊酸发酵液制备酮泛解酸
Fig.10 Ketopantoate synthesis from α-ketoisovalerate that produced by fermentation

表2 酮基泛解酸内酯萃取
Table 2 Ketopantoyl lactone extraction

Extractant	Distribution coefficient, <i>K</i> / (O/W)	Extraction yield/%
N-hexane	0.0±0.0	1.5±0.2
N-butanol	0.1±0.0	4.9±0.3
Isobutanol	1.0±0.2	50.9±1.2
CHCl ₃	0.0±0.0	1.5±0.1
CH ₂ Cl ₂	0.8±0.3	50.7±1.6

分别为50.9%±1.2%和50.7%±1.6%。考虑到异丁醇毒性较低，选做萃取剂，萃取后，向萃取相加入0.5wt%活性炭进行脱色，将脱色后的液体经减压浓缩后静置过夜，得到酮基泛解酸内酯粉末。

制备的酮基泛解酸内酯粉末溶于水后，调节pH至7~10范围内即可将内酯开环为酮泛解酸，整个制备涉及的各转化过程收率见表3。由表3可以看出，整个制备过程中除了异丁醇萃取酮基泛解酸内酯步骤收率较低

外,其他各步骤收率都很高,由于本实验仅采用一级萃取,工业中改为多级萃取将解决收率较低的问题。最终制备得酮泛解酸的总产率为 11.7%,酮基泛解酸内酯粉末的总产率为 5.2%。

表 3 各转化过程收率
Table 3 Yield of each conversion process

Original substance	Production substance	Process	Yield/%
Glucose	α -Ketoisovalerate (α -KIV)	Fed-batch fermentation	14.8
α -KIV fermentation broth	Ketopantoate	Aldol reaction	78.9
	Total yield of ketopantoate		11.7
Ketopantoate	Ketopantoyl lactone	Lactonization	90.3
Ketopantoyl lactone (KPL)	KPL organic phase	Isobutanol extraction	50.9
KPL organic phase	KPL powder	Concentration	97.7
	Total yield of ketopantoyl lactone		5.2

4 结 论

利用酮泛解酸内酯制备 D-泛解酸进而合成泛酸的技术方案已经提出很多年,其中酮泛解酸及其内酯的廉价制备是该技术的限制性问题。本研究通过发酵法制备了 α -酮基异戊酸, α -酮基异戊酸与甲醛反应制备酮泛解酸,开发了从葡萄糖经酮基异戊酸中间体制备酮基泛解酸和酮基泛解酸内酯的方法,得到以下结论:

- (1) 流加发酵 *Kp ΔbudAΔldhAΔipdC* 三敲菌株可生产 α -酮基异戊酸 25.2 g/L。
 - (2) 经商品 α -酮基异戊酸的初步验证,确定酮泛解酸能通过 α -酮基异戊酸和甲醛经羟醛缩合反应制备;分析反应机理,并确定反应级数为 1.87。
 - (3) 优化羟醛反应条件,确定最佳条件为:温度 45℃、NaOH 为催化剂、调节 pH 至 13,产率达 83.5%。
 - (4) 确定酮基泛解酸内酯由酮泛解酸在 pH<1 时制备效率最高,转化率达 90.3%;确定含 25.2 g/L 的 α -酮基异戊酸发酵液经最佳反应条件可制备酮泛解酸 19.9 g/L。
 - (5) 选取异丁醇作萃取剂萃取收率最高,为 50.9%;经活性炭脱色、浓缩后得到酮基泛解酸内酯粉末,调节内酯溶液 pH 于 7~10 范围内可开环得到酮泛解酸。
- 总体制备过程转化率较高,是一种廉价的酮泛解酸及其内酯的制备方法。同时本技术路线采用葡萄糖等可再生原料,工艺过程简单,反应条件温和,避免了剧毒原料氰化氢的引入。为泛酸生产提供了一种具有竞争性的新型技术路线。

参考文献

[1] Webb M E, Smith G A, Abell C. Biosynthesis of pantothenate [J]. Natural Product Reports, 2004, 21(6): 695–721.

[2] Gheita A A, Gheita T A, Kenawy S A. The potential role of B5: a stitch in time and switch in cytokine [J]. Phytotherapy Research, 2020, 34(2): 306–314.

[3] Liu Z Q, Sun Z H. Cloning and expression of d-lactonohydrolase cDNA from *Fusarium moniliforme* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(24): 1861–1865.

[4] 汪钊, 黄美娟, 高亮, 等. 化学酶法合成 D-泛解酸内酯的研究进展 [J]. 发酵科技通讯, 2016, 45(4): 193–198.

[5] Wang Z, Huang M J, Gao L, et al. Research progress of chemo-enzymatic synthesis of D-pantolactone [J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2016, 45(4): 193–198.

[6] 王永泽, 罗璇, 谈丹, 等. 面包酵母不对称还原酮基泛解酸内酯 [J]. 生物技术, 2009, 19(1): 65–68.

[7] Wang Y Z, Luo X, Tan D, et al. Asymmetry reduction of ketopantolactone by baker's yeast [J]. Biotechnology, 2009, 19(1): 65–68.

[8] 应向贤, 高亮, 张丽, 等. 酿酒酵母醛酮还原酶的克隆表达和酶学性质研究 [J]. 发酵科技通讯, 2017, 46(3): 129–133.

[9] Ying X X, Gao L, Zhang L, et al. Cloning, over-expression and characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae* CICC 1002 [J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2017, 46(3): 129–133.

[10] Si D, Urano N, Kataoka M, 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(4): 1619–1625.

[11] Sanchez J E, Gross P G, Goetze R W, et al. Evidence of kinetic cooperativity in dimeric ketopantoate reductase from *Staphylococcus aureus* [J]. Biochemistry, 2015, 54(21): 3360–3369.

[12] Cheng P F, Wang J P, Wu Y F, 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.

[13] Ying X X, Wang C, Shao S, et al. Efficient oxidation of methyl glycolate to methyl glyoxylate using a fusion enzyme of glycolate oxidase, catalase and hemoglobin [J]. Catalysts, 2020, 10(8): 943–955.

[14] Zhang B, Zhang X M, Wang W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for D-pantothenic acid production [J]. Food Chemistry, 2019, 294: 267–275.

[15] Zhou S P, Wang Z J, Zhao K, et al. High-level production of D-pantothenic acid from glucose by fed-batch cultivation of

- Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2020, 68(6): 1227–1235.
- [13] Chassagnole C, Audrey D, Létisse F, et al. Metabolic network analysis during fed-batch cultivation of *Corynebacterium glutamicum* for pantothenic acid production: first quantitative data and analysis of by-product formation [J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104(1): 261–272.
- [14] Tigu F, Zhang J L, Liu G X, et al. A highly active pantothenate synthetase from *Corynebacterium glutamicum* enables the production of D-pantothenic acid with high productivity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(14): 6039–6046.
- [15] Chen C, Wei D, Shi J P, et al. Mechanism of 2,3-butanediol stereoisomer formation in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(10): 4603–4613.
- [16] Zhou J D, Wang D X, Wang C H, et al. The role of the pyruvate acetyl-CoA switch in the production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 181(3): 1199–1210.
- [17] 李清, 黄艳娜, 李志敏, 等. 重组肺炎克雷伯菌发酵联产3-羟基丙酸和1,3-丙二醇 [J]. 过程工程学报, 2014, 14(1): 133–138.
Li Q, Huang Y N, Li Z M, et al. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by a recombinant strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2014, 14(1): 133–138.
- [18] Gu J J, Zhou J D, Zhang Z X, et al. Isobutanol and 2-ketoisovalerate production by *Klebsiella pneumoniae* via a native pathway [J]. Metabolic Engineering, 2017, 43: 71–84.
- [19] Denmark S E, Eklov B M, Yao P J, et al. On the mechanism of lewis base catalyzed aldol addition reactions: kinetic and spectroscopic investigations using rapid-injection NMR [J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(33): 11770–11787.
- [20] Neurock M, Tao Z, Chemburkar A, et al. Theoretical insights into the sites and mechanisms for base catalyzed esterification and aldol condensation reactions over Cu [J]. Faraday Discussions, 2017, 197: 59–86.
- [21] 伍艳辉, 任伟丽, 梁泽磊, 等. 乙醛液相羟醛缩合反应工艺和动力学 [J]. 化学反应工程与工艺, 2013, 29(1): 75–80.
- Wu Y H, Ren W L, Liang Z L, et al. Liquid-phase aldol condensation of acetaldehyde and its kinetics [J]. Chemical Reaction Engineering and Technology, 2013, 29(1): 75–80.
- [22] 郭鑫鹏. 丙烯酸甲酯的合成与分离的研究 [D]. 湘潭: 湘潭大学, 2016: 52–60.
- Guo X P. Research on methyl acrylate synthesis and separation [D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2016: 52–60.
- [23] 黄祖良, 韦国锋, 黄世稳, 等. 相转移催化合成2,2-羟甲基丁酸的研究 [J]. 化学世界, 2005, (11): 685–688.
Huang Z L, Wei G F, Huang S W, et al. Synthesis of 2,2-dimethylolbutyric acid with phase transfer catalyst [J]. Chemical World, 2005, (11): 685–688.
- [24] Anton D V, Jeroen L, Sabbe M K, et al. A comprehensive model for the role of water and silanols in the amine catalyzed aldol reaction [J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 404: 127070.
- [25] Arlegui A, Torres P, Cuesta V, et al. A pH-switchable aqueous organocatalysis with amphiphilic secondary amine-porphyrin hybrids [J]. European Journal of Organic Chemistry, 2020, 2020 (28): 4399–4407.
- [26] Kawanishi R, Hattori S, Iwasa S, et al. Amine-catalyzed decarboxylative aldol reaction of β -ketocarboxylic acids with trifluoropyruvates [J]. Molecules, 2019, 24(15): 2773.
- [27] Wang J F, Lei M, Li Q, et al. A novel and efficient direct aldol condensation from ketones and aromatic aldehydes catalyzed by proline-TEA through a new pathway [J]. Tetrahedron, 2009, 65 (25): 4826–4833.
- [28] Yasuhiro O, Yoshinori T, Hiroshi N, et al. Extraterrestrial hexamethylenetetramine in meteorites—a precursor of prebiotic chemistry in the inner solar system [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 6243.
- [29] Xie Q, Zhang L Y, Yu X H, et al. Thermal hazards for autocatalysis and stability in CSTR: decomposition of solution from nitrolysis of hexamethylenetetramine [J]. Propellants, Explosives, Pyrotechnics, 2020, 45(12): 1859–1869.
- [30] 贾卫斌, 潘劲松, 杨旭, 等. 二羟甲基丙酸合成工艺研究 [J]. 山东化工, 2010, 39(6): 6–13.
Jia W B, Pan J S, Yang X, et al. The synthesis technology of 2,2-bis(hydroxymethyl) propionic acid [J]. Shandong Chemical Industry, 2010, 39(6): 6–13.