

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2003 - 2410**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.03.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.03.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/274455**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.02.2004**  
(Věstník č. 2/2004)

(86) PCT číslo: **PCT/IB2002/001982**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO2002/072857**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 12 P 13/02**

**C 12 P 13/04**

**C 07 C 235/12**

(71) Přihlašovatel:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen, DE;

(72) Původce:

Beck Christine, Mannheim, DE;

Harz Hans-Peter, Dudenhofen, DE;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsoby pro zvýšenou produkci pantothenátu**

(57) Anotace:

Řešení se týká zlepšených metod pro produkci pantothenatových kompozic. Zvláště se týká způsobů kultivace mikroorganismů tak, že jsou produkovány sprejově sušitelné kompozice pantothenatu. Také se týká pantothenatových kompozic připravených zde popsánymi způsoby.

Způsob pro zvýšenou produkci pantothenatu

Příbuzné přihlášky

Tato přihláška si nárokuje práva z dříve podané předběžné patentové přihlášky číslo 60/274 455, podané 9. března 2001 (v řízení). Tento vynález je ve vztahu k US patentové přihlášce č. 09/667 569, podané 21. září 2000 (v řízení), která je částečným pokračováním US patentové přihlášky č. 09/400 494, podané 21. září 1999 (opuštěná). US patentová přihláška č. 09/667 569 také nárokuje práva vyplývající z dříve podané předběžné patentové přihlášky č. 60/210 072, podané 7. června 2000 (s prošlou lhůtou), předběžné patentové přihlášky č. 60/221 836, podané 28. července 2000 (s prošlou lhůtou) a předběžné patentové přihlášky č. 60/227 860, podané 24. srpna 2000 (s prošlou lhůtou). Na obsah všech výše uvedených přihlášek se tímto odkazuje.

#### **Dosavadní stav techniky**

Kyselina D-pantothenová je produkována světově ve velkém rozsahu. Velké množství syntetizované kyseliny D-pantothenové se používá jako potravinové aditivum pro drůbež a prasata. Poptávka po kyselině D-pantothenové stále stoupá.

Pantothenat, také známý jako kyselina pantothenová nebo vitamin B5, patří do komplexu vitaminů B a je požadován při výživě savců včetně dobytka a lidí (např. z potravinových zdrojů, jako ve vodě rozpustný vitaminový doplněk nebo jako potravinové aditivum). U buněk je pantothenat používán primárně pro biosyntézu koenzymu A (CoA) a ACP (proteinového přenašeče u acylu). Tyto koenzymy působí v metabolismu acylové části, která tvoří thioestery se sulfhydrylovou skupinou 4'-fosfopantothenové části těchto molekul. Tyto koenzymy jsou nezbytné u všech buněk,

neboť se účastní více než 100 různých mezireakcí buněčného metabolismu.

Konvenční způsob syntézy pantothenatu (zvláště bioaktivního D izomeru) představuje chemická syntéza z várky chemikálií, způsob, který je spojen s přílišnými náklady na substrát a s požadavky na optické rozlišení racemických meziproduktů. Proto se nedávno výzkum obrátil na bakteriální nebo mikrobiální systémy, které produkují enzymy užitečné při způsobech biosyntézy pantothenatu (neboť bakterie jsou samy schopny syntetizovat pantothenat). Jako způsoby výhodné produkce výhodného izomeru kyseliny pantothenové byly vyhodnoceny zvláště procesy biokonverze. Kromě toho způsoby přímé mikrobiální syntézy byly v poslední době zkoumány jako prostředky k usnadnění produkce D-pantothenatu.

Přesto stále existuje velká potřeba zlepšení způsobů produkce pantothenatu, zvláště mikrobiálních procesů optimalizovaných pro produkci vyšších výtěžků produktu a snadněji přečistitelného produktu.

### **Podstata vynálezu**

Tento vynález se týká zlepšených metod výroby pantothenatu, konkrétně způsobu výroby kompozic (přípravků) obsahujících Ca-D-pantothenat. Tento vynález se také týká způsobů produkce pantothenatových sprejově sušitelných (schopných sprejového sušení, tj. sušení v rozprašovací sušárně) kompozic, výhodně sprejově sušitelných kompozic, které obsahují Ca-D-pantothenat. Kompozice obsahující Ca-D-pantothenat a/nebo pantothenatové kompozice schopné sprejového sušení podle tohoto vynálezu mohou být vyrobeny fermentací mikroorganismů produkujících pantothenat z glukózy dodávání solí Ca v průběhu fermentace, výhodně dodáváním solí Ca v průběhu fermentace s řízeným pH. Ve

výhodném provedení kompozice obsahující Ca-D-pantothenat a/nebo pantothenatové kompozice schopné sprejového sušení jsou produkovány s dodáváním  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  v průběhu fermentace. Kompozice obsahující Ca-D-pantothenat a/nebo pantothenatové kompozice schopné sprejového sušení podle tohoto vynálezu mohou být produkovány fermentací pomocí mikroorganismů produkujících pantothenat, výhodně mikroorganismů, které byly vytvořeny inženýrstvím k přípravě pantothenatu způsobem nezávislým na prekurzoru. Kompozice obsahující Ca-D-pantothenat a/nebo pantothenatové kompozice schopné sprejového sušení mohou být produkovány fermentací pomocí mikroorganismů uzpůsobených k produkci pantothenatu způsobem bez potřeby prekurzorů, jako je  $\beta$ -alanin nebo kyselina pantoová (nebo pantoat). Také jsou představeny způsoby produkce Mg-D-pantothenatových kompozic a/nebo sprejově sušitelných kompozic, které obsahují Mg-D-pantothenat, například způsoby, které zahrnují dodávání solí Mg, výhodně při fermentaci řízené pH, nejvýhodněji dodáváním  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Kompozice obsahující Ca-D-pantothenat, Mg-D-pantothenatové kompozice a/nebo sprejově sušitelné kompozice se připravují z fermentačního média. Pantothenatové kompozice produkované způsoby podle tohoto vynálezu jsou prášky (nebo kompozice schopné být zpracované jako prášky), které obsahují soli pantothenatu, výhodně dvojjazné soli pantothenatu a zvláště výhodně Ca-D-pantothenat nebo Mg-D-pantothenat. Tyto způsoby výroby jsou daleko úspornější a účinnější než konvenční způsoby. Výsledné produkty mají mnoho komerčních použití, zvláště se používají jako vitaminové zdroje nebo potravinová aditiva.

Vynález se týká, alespoň z části, způsobů výroby sprejově sušitelné pantothenatové kompozice, který zahrnuje kultivaci mikroorganismů produkujících pantothenat za podmínek pH řízeného  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , tak, aby byla produkována sprejově sušitelná pantothenatová kompozice. Způsob může

dále zahrnovat sprejové sušení sprejově sušitelné kompozice. Výhodně obsahuje sprejově sušitelná pantothenatová kompozice Ca-D-pantothenat. Tento vynález se také týká pantothenatových kompozic vyrobených způsobem podle tohoto vynálezu.

Jiné znaky a výhody tohoto vynálezu budou zřejmé z následujícího detailního popisu a nároků.

### **Detailní popis vynálezu**

Vynález se alespoň z části týká způsobu výroby Ca-D-pantothenatu, výhodně způsobu výroby sprejově sušitelných Ca-D-pantothenatových kompozic. Způsob zahrnuje kultivaci mikroorganismu produkujícího pantothenat v přítomnosti Ca solí, výhodně v přítomnosti Ca solí za podmínek řízeného pH, zvláště výhodně za podmínek pH řízeného  $\text{Ca(OH)}_2$ , tak, aby byl produkován Ca-D-pantothenat nebo sprejově sušitelná Ca-D-pantothenatová kompozice. Tento vynález se také alespoň z části týká způsobu výroby Mg-D-pantothenatu, výhodně způsobu výroby sprejově sušitelné Mg-D-pantothenatové kompozice. Způsob zahrnuje kultivaci mikroorganismu produkujícího pantothenat v přítomnosti solí Mg, výhodně v přítomnosti solí Mg za podmínek řízeného pH, zvláště výhodně za podmínek pH řízeného  $\text{Mg(OH)}_2$ , tak, aby byl produkován Mg-D-pantothenat nebo sprejově sušitelná Mg-D-pantothenatová kompozice. Tento způsob může dále zahrnovat sprejové sušení sprejově sušitelné kompozice. Mikroorganismy produkující pantothenat mohou být kultivovány například ve fermentačním médiu nebo bujónu majících dále uvedené složení. Výhodně způsob zahrnuje kultivaci rekombinantních mikroorganismů produkujících pantothenat, které byly uzpůsobeny k produkci pantothenatu (například k produkci významných titrů pantothenatu způsobem nezávislým na dodání prekurzoru).

K tomu, aby byl vynález snadněji pochopitelný, jsou dále nejprve definovány určité pojmy.

Pojem „pantothenat“ zahrnuje volnou kyselou formu pantothenatu, také označovanou jako „pantothenová kyselina“, stejně jako její soli (například odvozené náhradou kyselého vodíku pantothenatu nebo kyseliny pantothenové kationtem, například vápníkem, sodíkem, draslíkem, amoniem), také označované jako „pantothenatová sůl“. Výhodnými pantothenatovými solemi jsou pantothenat vápenatý, pantothenat sodný, pantothenat hořečnatý, pantothenat draselný a/nebo pantothenat amonný. Pantothenatové soli podle tohoto vynálezu zahrnují soli připravené běžnými metodami ze zde popsaných volných kyselin. V jiném provedení je pantothenatová sůl syntetizována přímo mikroorganismem podle tohoto vynálezu. Pantothenatová sůl podle tohoto vynálezu může být podobně převedena na formu volné kyseliny pantothenatu nebo pantothenové kyseliny běžnými metodami. Výhodná pantothenatová sůl je Ca-D-pantothenat (tj.  $\text{Ca}(\text{D-pantothenat})_2$ ). Jinou výhodnou pantothenatovou solí je Mg-D-pantothenat (tj.  $\text{Mg}(\text{D-pantothenat})_2$ ). Způsoby produkce Ca-D-pantothenatu známé ze stavu techniky zahrnují výrobu Ca-D-pantothenatu z kyseliny D-pantothenové přidávkem ekvimolárního množství  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . D-pantothenat je rutinně izolován z fermentačního média nebo bujónu obsahujících D-pantothenat způsoby, které zahrnují ale nejsou omezeny na způsoby popsané ve WO 96/33283, US6013492 a DE10016321.

D-pantothenat může být připraven fermentací pomocí mikroorganismů na živné půdě obsahující zdroj uhlíku, jako jsou cukry (např. glukóza, sacharóza, melasy) nebo jiné karbohydráty (např. škrobové hydrolyzáty), prekurzory, jako je  $\beta$ -alanin, kyselina pantoová (nebo pantoat), ketopantoat (nebo kyselina ketopantoová),  $\alpha$ -ketoisovalerat (nebo

kyselina  $\alpha$ -ketoisovalerová) a podobně, zdroje dusíku, jako je  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , zdroje proteinu, jako je sojová mouka, kukuřičný extrakt a kvasničný extrakt, zdroje fosforu, jako jsou fosforečnan draselný nebo sodný a stopové prvky a vitamíny. Mikroorganismus je kultivován ve fermentačním médiu při vhodném pH za vhodného míchání a provzdušňování.

Pojem „pantothénatová kompozice“ označuje kompozice, které obsahují pantothénat a případně další složky, které zahrnují ale nejsou omezeny na pufrý, soli a/nebo jiné složky média, zbytky média (tj. zbytky složek komplexního média z fermentačního média), biomasu (například mikroorganismy a/nebo části nebo zbytky mikroorganismů z fermentačního bujónu) a/nebo složky média, které pomáhají při přípravě produktu (jako jsou cukry, produkty z cereálií nebo luštěnin, silikagel atd.).

Pojem „sprejově sušitelná pantothénatová kompozice“ zahrnuje pantothénatové kompozice, ze kterých mohou být kapalné složky odpařeny nebo jinak odstraněny pro získání pevné kompozice. Výhodně je sprejově sušitelná pantothénatová kompozice sprejově sušena nebo sprejově granulována (např. za použití sprejového sušiče s fluidním ložem), ačkoli mohou být použity i jiné způsoby odstranění kapalných složek (např. odpaření, lyofilizace a podobně). Sprejově sušitelná pantothénatová kompozice může být vysušena se separací nebo bez separace od biomasy od fermentačního média, například filtrací, odstředěním, ultrafiltrací, mikrofiltrací nebo jejich kombinací. V jednom provedení je vysušená sprejově sušitelná pantothénatová kompozice schopna zamýšlené funkce bez dalších kroků čištění. Vysušená sprejově sušitelná pantothénatová kompozice může být například přímo přidána do krmiva zvířat (např. krmiva pro drůbež nebo prasata)

nebo přidána do krmných premixů bez dalších kroků přečištění.

Příklady komerčně dostupných zařízení pro sprejové sušení zahrnují ty, které jsou vyrobeny firmami Niro nebo APV Anhydro (obě Copenhagen, Dánsko). Sprejové granulátory s fluidním ložem jsou vyráběny firmou Glatt (Bingen, Německo), Heinen (Varel, Německo), Niro-Aeromativ (Bubendorf, Švýcarsko) a Allgaier (Uhingen, Německo). Ve výhodném provedení je teplota na vstupu do sprejového sušiče nastavena na asi 100 °C až asi 280 °C a výhodně na asi 120° až asi 210 °C. Teplota na výstupu ze sprejového sušiče je nastavena na rozmezí asi 30 až asi 180 °C, výhodně na asi 50 °C až asi 150 °C a zvláště výhodně od asi 50 °C do asi 100 °C. Atomizace kapaliny je prováděna dvěma fluidizačními tryskami (pneumatické trysky, tlakové trysky) nebo rotačním diskem. Také FSD (fluidní sprejová sušárna) vyráběný firmou Niro (Copenhagen, Dánsko) nebo srovnatelné sušárny nazývané SBD (Spray Bed Dryer) vyráběné firmou APV Anhydro (Copenhagen, Dánsko) mohou být použity pro sušení. Tyto sušárny představují kombinaci sprejové sušárny a granulátoru s fluidním ložem. Během sušení je také možno dosáhnout určité aglomerace. Pro selekci distribuce stanovené velikosti částic v konečném produktu mohou být velmi malé částice odděleny na sítích a vráceny do procesu. Podobně mohou být velmi velké částice rozdrceny v mlýnu a vráceny do procesu.

Pojem „mikroorganismus produkující pantothenat“ zahrnuje přirozeně se vyskytující mikroorganismy, které produkují pantothenat, stejně jako mikroorganismy, například rekombinantní mikroorganismy, které mají deregulovanou cestu biosyntézy pantothenatu a/nebo deregulovanou cestu biosyntézy isoleucinu-valinu. Ve zde uvedeném smyslu pojem mikroorganismus „mající deregulovanou

cestu biosyntézy pantothenatu" zahrnuje mikroorganismus, který má deregulovaný alespoň jeden enzym pro biosyntézu pantothenatu (například nadměrně produkován expresí) tak, že je zvýšena produkce pantothenatu (například ve srovnání s produkcí pantothenatu v uvedeném mikroorganismu před deregulací uvedeného biosyntetického enzymu nebo ve srovnání s přirozeně se vyskytujícím typem mikroorganismu). Výhodně mikroorganismus „mající deregulovanou cestu biosyntézy pantothenatu" zahrnuje mikroorganismus mající deregulovaný (například nadměrně produkován expresí) alespoň jeden biosyntetický enzym tak, že je produkce pantothenatu 1 g/l nebo vyšší. Zvláště výhodně zahrnuje mikroorganismus „mající deregulovanou cestu biosyntézy pantothenatu" mikroorganismus, který má deregulovaný (například nadměrně produkován expresí) alespoň jeden enzym tak, že produkce pantothenatu je 2 g/l nebo vyšší.

Pojem „pantothenatový biosyntetický enzym" zahrnuje enzym používaný při tvorbě sloučeniny (například meziprojektu nebo produktu) cesty biosyntézy pantothenatu. Například syntéza pantothenatu z  $\alpha$ -ketoisovaleratu ( $\alpha$ -KIV) probíhá přes meziprojekt, ketopantoat. Tvorba ketopantoatu je katalyzována pantothenatovým biosyntetickým enzymem ketopantoathydroxymethyltransferasou (produkt genu *panB*). Tvorba pantoatu je katalyzována pantothenatovým biosyntetickým enzymem ketopantoatreduktasou (produkt genu *panE*). Syntéza  $\beta$ -alaninu z aspartatu je katalyzována pantothenatovým biosyntetickým enzymem aspartat- $\alpha$ -dekarboxylasou (produkt genu *panD*). Tvorba pantothenatu z pantoatu a  $\beta$ -alaninu (např. kondenzací) je katalyzována pantothenatovým biosyntetickým enzymem pantothenatsyntetasou (produkt genu *panC*).

Pojem „biosyntetická cesta isolelucinu-valínu" zahrnuje cestu biosyntézy zahrnující biosyntetické enzymy

pro biosyntézu isoleucinu-valinu (například polypeptidy kódované geny kódujícími biosyntetické enzymy), sloučeniny (například prekursor, substráty, meziprodukty nebo produkty), kofaktory a podobně používané při tvorbě nebo syntéze konverze pyruvátu na valin nebo isoleucin. Pojem „biosyntetická cesta isoleucinu-valinu“ zahrnuje biosyntetickou cestu vedoucí k syntéze valinu nebo isoleucinu v mikroorganismu (například *in vivo*) stejně jako biosyntetickou cestu vedoucí k syntéze valinu nebo isoleucinu *in vitro*.

Pojem „isoleucin-valinový biosyntetický enzym“ zahrnuje jakýkoli enzym použitý při tvorbě sloučeniny (např. meziprojektu nebo produktu) biosyntetické cesty isoleucinu-valinu. Syntéza valinu z pyruvátu probíhá přes meziprojekt, acetolaktat,  $\alpha, \beta$ -dihydroxisovalerat ( $\alpha, \beta$ -DHIV) a  $\alpha$ -ketoisovalerat ( $\alpha$ -KIV). Tvorba acetolaktátu z pyruvátu je katalyzována isoleucin-valinovým biosyntetickým enzymem acetohydroxykyselinasyntetatosu (produkt genu *ilvBN* nebo alternativně produkt genu *alsS*). Tvorba  $\alpha, \beta$ -DHIV z acetolaktátu je katalyzována isoleucin-valinovým biosyntetickým enzymem acetohydroxykyselina-diisomeroreduktasou (produkt genu *ilvC*). Syntéza  $\alpha$ -KIV z  $\alpha, \beta$ -DHIV je katalyzována isoleucin-valinovým biosyntetickým enzymem dihydroxykyselindehydratasou (produkt genu *ilvD*). Kromě toho valin a isoleucin mohou být vzájemně převedeny transaminasami aminokyselin s rozvětveným řetězcem.

V jednom provedení je rekombinantní mikroorganismus podle tohoto vynálezu gram-pozitivní organismus (například mikroorganismus, který zachycuje zásadité barvivo, například krystalovou violet v důsledku přítomnosti gram-pozitivních obalů stěny mikroorganismu). Ve výhodném provedení je rekombinantním mikroorganismem mikroorganismus

patřící do rodů vybraných ze skupiny sestávající z rodů *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Streptomyces*. Ve zvláště výhodném provedení je rekombinantní mikroorganismus rodu *Bacillus*. V jiném výhodném provedení je rekombinantní mikroorganismus vybrán ze skupiny sestávající z *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus pantothenicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis* a jiných druhů skupiny 1 *Bacillus species*, například jak je charakterizován typem rRNA 16S (Priest (1993) v *Bacillus subtilis* a jiné gram-pozitivní bakterie eds. Sonenshein et al., ASM, Washington, D.C., str. 6). V jiném výhodném provedení je rekombinantním mikroorganismem *Bacillus brevis* nebo *Bacillus stearothermophilus*. V jiném výhodném provedení je rekombinantní mikroorganismus vybrán ze skupiny sestávající z *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*.

V jiném provedení je rekombinantní mikroorganismus gram-negativní (nebarví se zásaditým barvivem) organismus. Ve výhodném provedení je rekombinantním mikroorganismem mikroorganismu patřící do rodů vybraných ze skupiny sestávající z rodů *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* a *Proteus*. Ve výhodném provedení je rekombinantním mikroorganismem mikroorganismu patřící do rodu *Escherichia*. Ve zvláště výhodném provedení je rekombinantním mikroorganismem *Escherichia coli*. V jiném provedení je rekombinantním mikroorganismem mikroorganismus z rodu *Saccharomyces* (např. *S. cerevisiae*). Mezi zvláště výhodné „mikoorganismy produkující pantothenat“ patří ty mikroorganismy, které jsou popsány například v US patentové přihlášce číslo 09/667569.

Pojem "kultivace" zahrnuje udržování a/nebo růst živých mikroorganismů podle tohoto vynálezu (např. udržování a/nebo kultivace kultury nebo kmene). V jednom provedení je mikroorganismus podle tohoto vynálezu kultivován v kapalném médiu, například fermentačním bujónu. Ve výhodném provedení je mikroorganismus podle tohoto vynálezu kultivován v médiu (například sterilním kapalném médiu) obsahujícím živné látky výhodné nebo nezbytné pro udržení a/nebo růst mikroorganismů (např. zdroje uhlíku nebo uhlíkaté substráty, například karbohydráty, uhlovodíky, oleje, tuky, mastné kyseliny, organické kyseliny a alkoholy, zdroje dusíku, například pepton, kvasničné extrakty, masové extrakty, sladové extrakty, močovina, síran amonný, chlorid amonný, dusičnan amonný a fosforečnan amonný; zdroje fosforu, například kyselina fosforečná, její sodné a draselné soli; stopové prvky, například soli hořčíku, železu, manganu, vápníku, mědi, zinku, boru, molybdenu a/nebo kobaltu; a růstové faktory, jako jsou aminokyseliny, vitaminy, růstové promotory a podobně).

Výhodně jsou mikroorganismy podle tohoto vynálezu kultivovány za podmínek řízeného pH. V jednom provedení se mikroorganismy kultivují při pH mezi 6,0 a 11,0. V jiném provedení se mikroorganismy kultivují při pH mezi 6,0 a 8,5, například při pH asi 7. Výhodná činidla pro řízení úpravu pH zahrnují hydroxid amonný, hydroxid sodný a/nebo hydroxid draselný. Použití těchto činidel k řízení pH je zvláště důležité, pokud jsou soli (například dvojmocné kationty, například  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) nebo  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgCl}_2$ ) přidány do fermentačního média). Ve výhodném provedení se mikroorganismy kultivují „za podmínek pH řízeného  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ “. Pojem „podmínky pH řízeného  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ “ zahrnuje podmínky, kdy alespoň část  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  byla přidána k získání žádaného produktu, například sprejově sušitelné Ca-pantothenatové

kompozice. Výhodně je požadované pH udržována přidavkem  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , pokud je to nezbytné, ke zvýšení pH, a pokud je to nezbytné, ke snížení pH se používá jakákoli metoda známá odborníkovi v oboru. V jiném výhodném provedení jsou mikroorganismy kultivovány za „podmínek pH řízeného  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ “. Pojem „podmínky pH řízeného  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ “ zahrnuje podmínky, kdy alespoň část  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  byla přidána k získání žádaného produktu, například sprejově sušitelné Ca-pantothenatové kompozice. Výhodně je požadované pH udržována přidavkem  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , pokud je to nezbytné, ke zvýšení pH, a pokud je to nezbytné ke snížení pH se používá jakákoli metoda známá odborníkovi v oboru.

Mikroorganismy jsou kultivovány za podmínek takových, že je produkováno alespoň 20 g/l pantothenatu během asi 36 hodin, alespoň 20 až 30 g/l je produkováno během asi 48 hodin nebo alespoň 35 až 40 g/l je produkováno během asi 72 hodin. Optimalizací média, procesu nebo kmene nebo kombinací tří koncentrací pantothenatu v konečném médiu může být dosaženo 40 g/l, 45 g/l, 50 g/l, 55 g/l, 60 g/l, 65 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l nebo více než 90 g/l.

Ca-D-pantothenat je široce používán jako potravinové aditivum. Ca-D-pantothenat se také nachází jako složka „premixů“. „Premixy“ jsou kompozice známé ze stavu techniky (například potravinová aditiva), které obsahují například vitamíny, minerální a/nebo aminokyseliny, které podporují růst a/nebo zdraví zvířat. Je proto vysoce žádoucí vyvinout způsob, při kterém je Ca-D-pantothenat produkován z obnovitelných zdrojů, jako jsou cukry, bez potřeby přísad jakýchkoli pantothenatových prekurzorů, například  $\beta$ -alaninu.

Pro tyto účely mohou být přidány ionty Ca k fermentačnímu médiu obsahujícímu kyselinu D-pantothenovou

nebo její soli před koncem fermentace v jakémkoli kroku v průběhu procesu, jak je popsáno v patentové přihlášce DE10046490. V jiném provedení mohou být ionty Ca přidány do fermentačního média během fermentace. Ionty Ca mohou být například přidány k fermentačnímu médiu živnými roztoky obsahujícími CaO, Ca(OH)<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, CaHPO<sub>4</sub> nebo s organickými solemi Ca, jako je Ca-formiat, Ca-acetat, Ca-propionat, Ca-glycinat nebo Ca-laktat nebo kombinace těchto solí. Mohou být také použity jiné soli Ca, tento výčet by neměl být považován za limitující. Výhodně jsou použity při fermentaci CaO nebo Ca(OH)<sub>2</sub>, protože tyto sloučeniny pomáhají úpravě pH. Výhodně se přidává alespoň 1 mol soli Ca na 2 mol produkovaného D-pantothenatu. V jiném provedení může být přidáno více než 1 mol soli Ca na 2 mol produkovaného D-pantothenatu. V dalším provedení se další výše uvedené soli Ca přidávají k fermentačnímu médiu přídatkem Ca soli poté, co byl fermentační proces ukončen (viz např. příklad 4 a 5).

Fermentační médium obsahující Ca-D-pantothenat může být sprejově sušeno nebo sprejově granulováno, jak je zde popsáno. V jednom provedení se přidávají k fermentačnímu médiu před nebo během procesu sprejového sušení nebo sprejové granulace sloučeniny, jako jsou cukry, například laktóza nebo maltodextrin, produkty z obilovin nebo luštěnin, například zrna, otruby nebo mouka ze sóji nebo pšenice, minerální soli, například soli Ca, Mg, Na a K, aditiva, jako jsou silikagel a také kyselina D-pantothenová a/nebo její soli (produkované chemickou syntézou nebo fermentací).

Ve výhodném provedení se nepřidávají žádné další složky a fermentační médium se přímo sprejově suší.

V jednom provedení se biomase oddělí od fermentačního média a sprejově se suší pouze supernatant. Separace od

biomasy se provádí technikami, jako je filtrace, odstředění, ultrafiltrace, mikrofiltrace nebo jejich kombinace. Získaná biomasa může být podrobena promývacímu kroku, kapalina se může přidat k oddělenému fermentačnímu supernatantu. V jiném provedení se fermentační médium obsahující biomasu sprejově suší bez separace biomasy. V ještě dalším provedení se fermentační médium sprejově suší bez dalšího koncentračního kroku.

V dalším provedení se provádí koncentrace fermentačního média. Následkem toho se zvyšuje obsah sušiny. Toho může být například dosaženo odstraňováním vody odpařením. Odpaření se může provádět v několika krocích a zavakua. Odpaření může být prováděno na tenkovrstvých odparkách, které jsou vyráběny například společnostmi GIG (4900 Attnang Puchheim, Rakousko), GEA Canzler (52303 Düren, Německo), Diessel (31103 Hildesheim, Německo) a Pitton (35274 Kirchheim, Německo). Obsah sušiny ve fermentačním médiu může být také zvýšen použitím membránových technik (např. nanofiltrace, reverzní osmózy atd.). Po odpaření může být obsah sušiny od asi 20 % do asi 80 %. V jednom provedení se odstraněná voda vrací do fermentačního média, čímž se snižuje množství produkované odpadní vody.

V jednom provedení se sterilizace fermentačního média provádí ve fermentoru (fermentačního tanku) přímo po ukončení fermentace. V jiném provedení se sterilizace provádí poté, co médium opustilo fermentor. Také je možná sterilizace kultivačního supernatantu po odstranění biomasy z fermentačního média prostřednictvím výše uvedené separace.

Sušení nebo zpracování fermentačního média může být provedeno obvyklými způsoby známými ze stavu techniky. Například může být použito sprejového sušení, sprejově

granulace ve fluidní vrstvě nebo rychlého vysušení fermentačního média metodou „spin-flash“ (Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6. vydání, 1999, elektronická verze, kapitola "Drying of solid materials").

Produkt získaný pomocí tohoto vynálezu může obsahovat kromě Ca-D-pantothenatu jiné složky fermentačního média, například fosfáty, uhličitany, zbylé karbohydráty, biomasu, složky komplexního média atd. Produkt má obvykle bílou až hnědou barvu, obsah vody je méně než 5 %, výhodně 1 až 3 %. K zabránění tvorby hrudek by neměl obsah vody přesáhnout 5 %. Obsah Ca-D-pantothenatu je 10 až 90 %, výhodně 20 až 80 %, zvláště výhodně 50 až 80 %.

Podobně může být připraveno fermentační médium obsahující Ca-D-pantothenat připravený z glukózy bez potřeby přídavku  $\beta$ -alaninu nebo jakéhokoliv jiného pantothenatového prekurzoru při dosažení titrů D-pantothenatu 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a více než 90 g/l. Ve výhodném provedení jsou mikroorganismy podle tohoto vynálezu kultivovány za řízené aerace (provzdušnění). Pojem „řízená aerace“ zahrnuje dostatečnou aeraci (například kyslíkem) k dosažení produkce požadovaného produktu (například sprejově sušitelného pantothenatu). V jiném provedení je aerace řízena regulací hladin kyslíku v kultuře, například regulace množství kyslíku rozpuštěného v kultivačním médiu. Výhodně je aerace kultury řízena mícháním kultury. Míchání může být provedeno míchadlem nebo obdobným zařízením pro mechanické míchání, obracením nebo protřepáváním kultivační nádoby (například zkumavky nebo baňky) nebo různým pneumatickým zařízením. Aerace může být dále řízena proháněním sterilního vzduchu nebo kyslíku přes médium (například fermentační směsí). mikroorganismy podle tohoto vynálezu jsou také výhodně

kultivovány bez nadměrného pění (například přidavkem odpěňovadel).

Kromě toho mohou být mikroorganismy podle tohoto vynálezu kultivovány za řízených teplot. Pojem „řízená teplota“ zahrnuje jakoukoli teplotu, která má za následek produkci požadovaného produktu (například sprejově sušitelného pantothenatu). V jednom provedení řízené teploty zahrnuje teploty mezi 15 °C a 95 °C. V jiném provedení řízené teploty zahrnují teploty mezi 15 °C a 70 °C. Výhodně teploty jsou mezi 20 °C a 55 °C, zvláště výhodně mezi 30 °C a 50 °C.

Mikroorganismy mohou být kultivovány (například udržovány a/nebo podrobeny růstu) v kapalném médiu a výhodně jsou kultivovány buď kontinuálně nebo přetržitě obvyklými kultivačními metodami, jako je stálá kultura, zkumavková kultura, protřepávaná kultura (například v rotační protřepávačce, protřepávačce na baňky atd.), provzdušňovaná kultura nebo fermentace. Ve výhodném provedení jsou mikroorganismy kultivovány v protřepávaných baňkách. Ve zvláště výhodném provedení jsou mikroorganismy kultivovány ve fermentačních tancích (například fermentačním procesem). Fermentační procesy podle tohoto vynálezu zahrnují ale nejsou omezeny na vsádkové, vsádkové s doplňovanou vsádkou a kontinuální procesy. Pojem „vsádkový proces“ nebo „vsádková fermentace“ označuje systém, kde složení média, živin, dodatečných aditiv a podobně je připraveno na začátku fermentace a není předmětem změn během fermentace, avšak mohou být prováděny pokusy řídit takové faktory, jako je pH a koncentrace kyslíku, k zabránění přílišného okyselení média a/nebo smrti mikroorganismů. Pojem „proces vsádkový s doplňovanou vsádkou“ nebo fermentace „vsádková s doplňovanou vsádkou“ označuje vsádkovou fermentaci s tou výjimkou, že se přidává

jeden nebo více substrátů nebo doplňků (např. přidávané po dávkách nebo kontinuálně) v průběhu fermentace. Pojem „kontinuální proces“ nebo „kontinuální fermentace“ označuje systém, ve kterém je definované fermentační médium přidáváno kontinuálně do fermentačního tanku a stejné množství použitého nebo „upraveného“ média je současně odváděno, výhodně za účelem získání požadovaného produktu (například sprejově sušitelné pantothenatové kompozice). Byla vyvinuta řada variant těchto procesů, která je dobře známá ze stavu techniky.

V jednom provedení není sprejově sušitelná pantothenatová kompozice vyčištěna od mikroorganismů, například pokud nejsou mikroorganismy biologicky nebezpečné (např. bezpečné). Kompletní kultivační nebo fermentační médium (nebo supernatant) může být použito jako zdroj produktu (např. surového produktu). V jiném provedení je kultivační médium (nebo kultivační supernatant) zahuštěno. V ještě dalším provedení je kultivační médium (nebo kultivační supernatant) vysušeno nebo lyofilizováno.

Způsob přípravy podle tohoto vynálezu má za následek produkci požadované sloučeniny při značně vysokém výtěžku. Pojem „značně vysoký výtěžek“ zahrnuje úroveň produkce nebo výtěžku, které jsou dostatečně zvýšeny na hladinu dostatečnou pro komerční produkci požadovaného produktu (např. produkci produktu při komerčně přijatelných nákladech). V jednom provedení tento vynález představuje způsob přípravy, který zahrnuje kultivaci rekombinantního mikroorganismu za takových podmínek, že požadovaný produkt (např. pantothenat) je produkován v množství vyšším než 2 g/l. V jiném provedení tento vynález zahrnuje způsob přípravy, který zahrnuje kultivaci rekombinantního mikroorganismu za takových podmínek, že požadovaný produkt (např. pantothenat) je produkován v množství vyšším než 10

g/l. V jiném provedení tento vynález představuje způsob přípravy, který zahrnuje kultivaci rekombinantního mikroorganismu za takových podmínek, že požadovaný produkt (např. pantothenat) je produkován v množství vyšším než 20 g/l. V ještě dalším provedení tento vynález představuje způsob přípravy, který zahrnuje kultivaci rekombinantního mikroorganismu za takových podmínek, že požadovaný produkt (např. pantothenat) je produkován v množství vyšším než 30 g/l. V ještě dalším provedení tento vynález představuje způsob přípravy, který zahrnuje kultivaci rekombinantního mikroorganismu za takových podmínek, že požadovaný produkt (např. pantothenat) je produkován v množství vyšším než 40 g/l. V ještě dalším provedení tento vynález představuje způsob přípravy, který zahrnuje kultivaci rekombinantního mikroorganismu za takových podmínek, že požadovaný produkt (např. pantothenat) je produkován v množství vyšším než 50 g/l. V ještě dalším provedení tento vynález představuje způsob přípravy, který zahrnuje kultivaci rekombinantního mikroorganismu za takových podmínek, že požadovaný produkt (např. pantothenat) je produkován v množství vyšším než 60 g/l. Tento vynález dále představuje způsob přípravy požadované sloučeniny, který zahrnuje kultivaci rekombinantního mikroorganismu za takových podmínek, že dostatečně zvýšené množství sloučeniny je produkováno v komerčně žádoucím časovém období.

V ještě dalším provedení tento vynález zahrnuje způsob přípravy, který zahrnuje kultivaci rekombinantního organismu za takových podmínek, že je produkován požadovaný produkt (např. pantothenat), shromáždění kultury, oddělení biomasy od média (nebo ne), sterilizaci kultury (před nebo po oddělení biomasy) zakoncentrování média (nebo ne) a vysušení kultury výše popsáním způsobem, tak, že je Ca-D-pantothenat obsažen v produktu v množství vyšším než 10% (20 - 30 - 40 % atd.)

Tento vynález je dále ilustrován následujícími příklady, které by neměly být považovány za omezující. Na obsah všech odkazů, patentů a publikovaných patentových přihlášek, které jsou citovány v této přihlášce, se tímto odkazuje.

### Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Příprava Ca-pantothenatu pomocí kmene PA668-24

V laboratorním fermentačním tanku o obsahu 20 l (Infors AG, Švýcarsko) byly připraveny 4 litry vodného fermentačního média podle následující tabulky:

Látka	Konečná koncentrace
Sojová mouka	40 g/l
Kvasničný extrakt	5 g/l
Glutamat sodný	5 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8 g/l
Tego KS 911 (odpěňovadlo)	1 ml/l

Byla přidána voda do 4 l objemu. Po sterilizaci (121 °C, 30 min) byl přidán 1 litr sterilního roztoku. Koncentrace složek média (bujónu) je následující:

Látka	Koncentrace
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 g/l
Glukóza	20 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g/l
MgCl <sub>2</sub>	1 g/l
Citrat sodný	1 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
SM-1000x	1 ml/l

Roztok stopových prvků SM-1000x o následujícím složení: 0,15 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 2,5 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,7 g  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  byl rozpuštěn ve vodě a byl doplněn do 1 litru. SM-1000x byl přidán sterilní trubičkou do vsádky fermentačního média.

K počátečnímu objemu 5 litrů bylo přidáno do vsádky média inokulum kultury (OD = 10 v médiu SVY) kmene PA668-24 *Bacillus subtilis*.

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 100 ml média SVY v mrazu uchovaného kmene PA668-24 doplněného 15 mg/tetracyklinu a 5 ml/l chloramfenikolu. Médium SVY vyrobené ze sterilní směsi 25 g bujónu Difco Veal Infusion, 5 g kvasničného extraktu Difco, 5 g glutamatu sodného a 2,7 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  v 740 ml vody. K sterilnímu médiu byl přidán 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7) a 60 ml sterilního roztoku glukózy k dosažení konečného objemu jeden litr. Kultura byla poté inkubována při 37 °C po dobu 12 až 18 hodin na rotační míchačce.

Zásobní zamrazená kultura byla připravena v 250 ml Erlenmayerově baňce s míchací zarážkou. 50 ml média SVY-Medium bylo doplněno 15 ml/l tetracyklinu a 5 mg/l chloramfenikolu a zaočkováno kmenem PA668-24 z jedné kolonie na agarové desce. Po inkubaci na rotační míchačce přes noc bylo ke kultuře přidáno 10 ml sterilního 80% glycerolového roztoku. Byly připraveny 1ml alikvotní díly v kryozkumavkách a byly individuálně zamrazeny při -80 °C.

Po zaočkování byla započata fermentace. Teplota byla nastavena na 43 °C. Počáteční otáčky míchadla byly nastaveny na 400 ot/min a počáteční průtok vzduchu na 4 l/min. Všechny fermentace představovaly vsádkové procesy limitované přídatkem glukózy. Původní dávka 2 % glukózy byly zkonsumována během exponenciálního růstu. Poté byly

koncentrace glukózy udržovány mezi 0 a 1 g/l kontinuálním přídávkem roztoku glukózy, jak je uvedeno v následující tabulce:

Látka	Konečná koncentrace
Glukóza	600 g/l
Glutamat sodný	5 g/l
Citrat sodný	2 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,02 g/l
SM-1000x	2 ml/l

Během prvních 8 hodin fermentace bylo pH udržováno přídávkem 25% roztoku NH<sub>3</sub>. Poté bylo pH řízeno přídávkem 25% vodné suspenze Ca(OH)<sub>2</sub> k fermentačnímu bujónu ke zvýšení pH, pokud to bylo nezbytné. V případě, že pH bylo mimo výhodné rozmezí pH, bylo sníženo přídávkem 20% kyseliny fosforečné. Rychlost míchadla a průtoku vzduchu byly regulovány podle hodnoty rozpuštěného kyslíku (pO<sub>2</sub>), která byla nastavena na 20 % hodnoty nasycení. Dodávání roztoku glukózy bylo řízeno algoritmem spojeným s hodnotou pO<sub>2</sub>. K omezení pění bylo příležitostně přidáváno oděňovací činidlo. Po 48 hodinách fermentace bylo dodávání roztoku glukózy ukončeno.

Poté, co hodnota pO<sub>2</sub> dosáhla hodnoty 95 %, byl fermentační bujón odebrán. Koncentrace D-pantothenátu byla 21,4 g/l. Biomasa byla oddělena odstředěním. Buňky zůstávající v supernatantu byly zabity sterilací při 212 °C po dobu 30 minut, což bylo potvrzeno nanesením vzorku bujónu na agarovou desku (Difco Tryptone Blood Agar Broth, 33 g/l, doplněné 30 g/l tetracyklinu a 30 mg/l chloramfenikolu) a inkubací přes noc při 37 °C a byly zkontrolovány z hlediska růstu kolon. Koncentrace D-pantothenátu ve výsledném supernatantu byla 15 g/l.

Fermentační bujón byl zahuštěn na tenkovrstvé odparce na konečný obsah sušiny 21 %. Koncentrovaný fermentační bujón obsahoval 55,4 g/l Ca-D-pantothenatu.

Příklad 2: Připravené fermentační médium obsahující Ca-D-pantothenat

Pět set gramů koncentrovaného fermentačního bujónu vytvořeného v příkladu 1 bylo vysušeno v laboratorní sprejové sušárně se dvěma rozprašovacími tryskami o průměru 1,2 mm (Minor "Hi-Tec", Niro, Copenhagen, Dánsko). Homogenita suspenze fermentačního bujónu byla udržována stálým mícháním. Teplota na vstupu byla 185 až 192 °C, teplota na výstupu byla 88 až 91 °C a tlak vzduchu byl 2 bar.

Bylo získáno 74,8 g žlutě hnědavého prášku při výtěžku 70 %. Prášek obsahoval 25 % Ca-D-pantothenat. Obsah vlhkosti byl 1,7 %.

Příklad 3: Připravené fermentační médium obsahující Ca-D-pantothenat

Pět set gramů koncentrovaného fermentačního bujónu vytvořeného v příkladu 1 bylo vysušeno v laboratorní sprejové sušárně s dvěma rozprašovacími tryskami o průměru 1,2 mm (Minor "Hi-Tec", Niro, Copenhagen, Dánsko). Homogenita suspenze fermentačního bujónu byla udržována stálým mícháním. Teplota na vstupu byla 153 až 159 °C, teplota na výstupu byla 72 až 78 °C a tlak vzduchu byl 2 bar.

Bylo získáno 79,2 g žlutě hnědavého prášku. Prášek obsahoval 24,1 % Ca-D-pantothenatu. Obsah vlhkosti byl 1,9 %.

#### Příklad 4

K 500 g koncentrovaného fermentačního bujónu vytvořeného v příkladu 1 bylo přidáno 2,2 g pevného  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ke zvýšení zásaditosti roztoku na pH 10. Roztok byl vysušen v laboratorní sprejové sušárně s dvěma rozprašovacími tryskami o průměru 1,2 mm (Minor "Hi-Tec", Niro, Copenhagen, Dánsko). Homogenita suspenze fermentačního bujónu byla udržována stálým mícháním. Teplota na vstupu byla 135 až 143 °C, teplota na výstupu byla 73 až 77 °C. Tlak vzduchu byl 2 bar.

Bylo získáno 82,4 g žlutě hnědavého prášku. Prášek obsahoval 23,7 % Ca-D-pantothenatu. Obsah vlhkosti byl 1,6 %.

#### Příklad 5

K 500 g koncentrovaného fermentačního bujónu vytvořeného v příkladu 1 bylo přidáno 5 g pevného  $\text{CaCl}_2$  ke zvýšení zásaditosti roztoku na pH 10. Roztok byl vysušen v laboratorní sprejové sušárně s dvěma rozprašovacími tryskami o průměru 1,2 mm (Minor "Hi-Tec", Niro, Copenhagen, Dánsko). Homogenita suspenze fermentačního bujónu byla udržována stálým mícháním. Teplota na vstupu byla 129 až 130 °C, teplota na výstupu byla 75 až 78 °C. Tlak vzduchu byl 2 bar.

Bylo získáno 65,1 g žlutě hnědavého prášku. Prášek obsahoval 23,4 % Ca-D-pantothenatu. Obsah vlhkosti byl 1,7 %.

## Příklad 6: Příprava Ca-pantothenatu pomocí kmene PA668-2A

V laboratorním fermentačním tanku o obsahu 20 l (Infors AG, Švýcarsko) byly připraveny 4 litry vodného fermentačního média podle následující tabulky:

Látka	Konečná koncentrace
Sojová mouka	40 g/l
Kvasničný extrakt	5 g/l
Glutamat sodný	5 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8 g/l
Tego KS (odpěňovadlo)	1 ml/l

Byla přidána voda do 4 l objemu. Po sterilizaci při 121 °C po dobu 30 min byl přidán 1 litr sterilního roztoku k dosažení konečných koncentrací uvedených v následující tabulce:

Látka	Konečná koncentrace
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 g/l
Glukóza	20 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g/l
MgCl <sub>2</sub>	1 g/l
Citrat sodný	1 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
SM-1000x	1 ml/l

Roztok stopových prvků SM-1000x je složen z kombinace: 0,15 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,7 g CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 0,25 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 1,6 g MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O a 0,3 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O rozpuštěné v jednom litru vody. Roztok stopových prvků

SM-1000x byl přidán sterilní trubičkou do vsádky fermentačního média.

Počáteční objem vsádky fermentačního média byl 5 litrů. Ke vsádce bylo přidáno 100 ml kultury (OD = 10 v médiu SVY) kmene PA668-2A *Bacillus subtilis*.

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 100 ml média SVY (doplněného 15 mg/tetracyklinu a 5 ml/l chloramfenikolu) kryoskopicky uchovaným kmenem PA668-2A. SVY médium: 25 g bujónu Difco Veal Infusion, 5 g kvasničného extraktu Difco, 5 g glutamatu sodného, 2,7 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  v 740 ml vody sterilizovat; přidat 200 ml sterilního 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7) a 60 ml sterilního 50% roztoku glukózy (konečný objem 1 l). Kultura byla poté inkubována při 37 °C po dobu 12 až 18 hodin na rotační míchačce.

Zásobní zamrazená kultura byla připravena v 250 ml Erlenmayerově baňce s míchací zarážkou. 100 ml média SVY (doplněného 15 ml/l tetracyklinu a 5 mg/l chloramfenikolu) bylo zaočkováno kmenem PA668-2A z jedné kolonie na agarové desce. Po inkubaci na rotační míchačce přes noc bylo ke kultuře přidáno 10 ml sterilního 80% glycerolového roztoku. Byly připraveny 1ml alikvotní díly v kryozkumavkách, které byly individuálně zamrazeny při -80 °C.

Po zaočkování byla započata fermentace. Teplota byla nastavena na 43 °C, počáteční otáčky míchadla byly nastaveny na 400 ot/min a počáteční průtok vzduchu na 4 l/min.

Všechny fermentace představovaly vsádkové procesy limitované přidavkem glukózy. Původní dávka 2 % glukózy byly zkonsumována během exponenciálního růstu. Poté byly koncentrace glukózy udržovány mezi 0 a 1 g/l kontinuálním přidavkem roztoku glukózy, jak je uvedeno v následující tabulce:

Látka	Konečná koncentrace
Glukóza	800 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,6 g/l
Glutamat sodný	5 g/l
Citrat sodný	2 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,02 g/l
SM-1000x	2 ml/l

Během prvních 24 hodin fermentace bylo pH udržováno přidavkem 25% roztoku NH<sub>3</sub>. Poté bylo pH řízeno přidavkem 25% vodné suspenze Ca(OH)<sub>2</sub> k fermentačnímu bujónu. Pro vyrovnání zřídka se objevujícího zásaditého pH byla přidávána 20% kyselina fosforečná. Rychlost míchadla a průtoku vzduchu byly regulovány podle hodnoty rozpuštěného kyslíku (pO<sub>2</sub>), která byla nastavena na 20 % hodnoty nasycení. Dodávání roztoku glukózy bylo řízeno algoritmem spojeným s hodnotou pO<sub>2</sub>. K omezení pění bylo příležitostně přidáváno odpěňovací činidlo. Po 48 hodinách fermentace bylo dodávání roztoku glukózy ukončeno. Koncentrace D-pantothenatu byla asi 44,8 g/l. Poté, co hodnota pO<sub>2</sub> dosáhla hodnoty 95 %, byl fermentační bujón sterilizován při 121 °C po dobu 30 minut. Úspěšnost sterilizace může být prokázána nanesením vzorku bujónu na agarovou desku (Difco Tryptone Blood Agar Broth, 33 g/l, doplněno 30 g/l tetracyklinu a 30 mg/l chloramfenikolu) a inkubací přes noc při 37 °C a poté kontrolou z hlediska růstu kolon. Biomasa nebyla odstraněna z bujónu, který obsahoval 38 g/l D-pantothenatu.

Bujón byl zahuštěn na tenkovrstvé odparce na konečný obsah sušiny 30 %.

Příklad 7: Připravené fermentační médium obsahující Ca-D-pantothenat a biomasu

500 g Koncentrovaného fermentačního bujónu vytvořeného v příkladu 6 bylo vysušeno v laboratorní sprejové sušárně s dvěmi rozprašovacími tryskami o průměru 1,2 mm (Minor "Hi-Tec", Niro, Copenhagen, Dánsko). Homogenita suspenze fermentačního bujónu byla udržována stálým mícháním. Teplota na vstupu byla 185 až 192 °C, teplota na výstupu byla 88 až 91 °C. Tlak vzduchu byl 2 bar.

Bylo získáno 105 g žlutě hnědavého prášku obsahujícího Ca-D-pantothenat. Výtěžnost byla 70 %.

Kmeny použité ve výše uvedených příkladech byly získány následujícím postupem.

Výchozím bodem pro získání kmene s produkcí pantothenatu byl *Bacillus subtilis* kmen 168 (Marburg Stamm ATCC 6051), který měl genotyp *trpC2* (*Trp*)<sup>-</sup>. Z kmene 168 *B. subtilis* byl vytvořen kmen PY79 transdukci markeru *Trp* (z přirozeně se vyskytujícího typu W23 *Bacillus subtilis*). Do kmene PY79 byly zavedeny mutace  $\Delta$ *panB* a  $\Delta$ *panE1* klasickým genovým inženýrstvím (jak je například popsáno v Harwood, C. R. a Cutting, S. M. (vydavatelé) *Molecular Biologicyl Methods for Bacillus* (1990), John Willey & Sons, Ltd, Chicheter, Anglie).

Výsledný kmen byl transformován genomovou DNA z kmene PA221 *Bacillus subtilis* (genotyp  $P_{26}$ *panBCD*, *trpC2* (*Trp*)<sup>-</sup>) a genomovou DNA z kmene PA303 *Bacillus subtilis* (genotyp  $P_{26}$ *panE1*). Výsledný kmen PA327 měl genotyp  $P_{26}$ *panE1* a je auxotrofní pro tryptofan (*Trp*)<sup>-</sup>.

S kmenem PA327 *Bacillus subtilis* bylo dosaženo v médiu SVY-Medium (25 g/l Difco Veal Infusion Broth, 5g/l kvasničný extrakt Difco, 5 g/l Na-glutamatu, 2,7 g/l (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> rozpuštěno ve vodě, zředěno na 740 ml vodou,

sterilizováno, přidáno 200 ml 1 M fosforečnanu draselného, pH 7,0 a 60 ml 50% sterilního roztoku glukózy), který byl doplněn 5 g/l  $\beta$ -alaninu a 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovaleratu.

Příprava kmene PA221 (genotyp  $P_{26}panBCD$ ,  $trpC2$  ( $Trp^-$ )) je popsána v následujícím odstavci:

Klasickými způsoby genového inženýrství byl operon  $panBCD$  z *Bacillus* klonován z plazmidové knihovny *Bacillus subtilis* GP275 za použití sekvenční informace z  $panBCD$  operonu *E. coli* (viz Merkel et al., FEMS Microbiol. Lett. 143, 1996: 247-352).

Pro proceduru klonování byl použit kmen *E. coli* BM4062 ( $bir^{ts}$ ) a informace, že operon *Bacillus* je umístěn blízko místa genu  $birA$ . Operon  $panBCE$  byl klonován do replikovatelného plazmidu *E. coli*. Pro zvýšení exprese operonu  $panBCD$  byly použity silné konstitutivní promotory fágu SP01 *Bacillus subtilis* (např.  $P_{26}$ ). Kromě toho ribozomální vazebné místo RBS proti směru exprese genu  $panB$  bylo zaměněno umělým RBS majícím sekvenci CCCTCT-AG-AAGGAGGAGAAAACATG. Proti směru exprese byla vložena kazeta  $P_{26}panBCD$  na plazmid DNA fragmentu, která je přirozeně umístěna bezprostředně proti směru exprese nativního genu  $panB$  v *Bacillus*. Plazmid byl převeden do kmene RL-1 *Bacillus subtilis* (klasickou mutagenézí odvozený derivát *Bacillus subtilis* 168 (kmen Marburg ATCC 6051), genotyp  $trpC2$  ( $Trp^-$ )) homologní rekombinací nativního  $panBCD$  operonu byl nahrazen  $P_{26}panBCD$ ,  $trpC2$  ( $Trp^-$ ).

S kmenem PA221 *Bacillus subtilis* byly titry pantothenatu až 0,92 g/l (24 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium, které bylo doplněno 5 g/l  $\beta$ -alaninu a 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovaleratu.

Způsob přípravy kmene PA303 *Bacillus subtilis* (genotyp  $P_{26}panE1$ ) je popsán dále:

Se znalostí sekvence genu *E. coli panE* byl klonován gen *Bacillus panE*. Je zajímavé že dva geny *B. subtilis*, které byly nazvány *panE1* a *panE2*, jsou homologní s genem *E. coli panE*. Analýzou bylo ukázáno, že gen *panE1* je odpovědný za 90 % produkce pantothenátu, přičemž delece genu *panE2* nemá žádný podstatný účinek na produkci pantothenátu. Byl zde také nahrazen promotor silným konstruktivním promotorem  $P_{26}$  a ribozomální vazebné místo proti směru exprese *panE1* bylo zahrazeno umělým RBS.

Fragment  $P_{26}panE1$  byl klonován na plazmidový vektor, který byl vytvořen tak, aby se fragment  $P_{26}panE1$  mohl napojit na originální nativní *panE1* místo v genomu *Bacillus subtilis*. Po transformaci a homologní rekombinaci byl výsledný kmen nazván PA303, který byl charakterizován genotypem  $P_{26}panE1$ .

S kmenem PA303 *Bacillus subtilis* byly titry pantothenátu až 1,66 g/l (24 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium, které bylo doplněno 5 g/l  $\beta$ -alaninu a 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovalerátu.

Další vývoj kmene byl proveden transformací PA327 plazmidem, který obsahoval operon  $P_{26}ilvBNC$  a markerový gen pro spektinomycin. Operon  $P_{26}ilvBNC$  byl napojen na místo *amyE*, což bylo potvrzeno PCR analýzou. Jeden z produktů transformace byl nazván jako kmen PA340 (genotyp  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  $P_{26}ilvBNC$ , *specR*, *trpC2* ( $Trp^-$ )).

S kmenem PA340 *Bacillus subtilis* byly dosaženy titry pantothenátu až 3,6 g/l (24 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium, které bylo doplněno 5 g/l  $\beta$ -alaninu. V 10 ml kultury v médiu SVY-Medium, které bylo doplněno 5 g/l  $\beta$ -alaninu a 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovalerátu byly dosaženy titry až 4,1 g/l (24 h).

Dále byla zavedena do kmene PA340 deregulovaná *ilvD* kazeta. Pro tento účel byl plazmid, který obsahoval gen *ilvD* za řízení promotoru  $P_{26}$  a umělé RBS zaveden do PA340.

Homologní rekombinací genu *P<sub>26</sub>ilvD* byl zaveden do nativního místa *ilvD*. Výsledný kmen PA374 měl genotyp *P<sub>26</sub>panBCD*, *P<sub>26</sub>panE1*, *P<sub>26</sub>ilvBNC*, *P<sub>26</sub>ilvD*, *specR* a *trpC2* ( $\text{Trp}^-$ ).

S kmenem PA374 *Bacillus subtilis* byly dosaženy titry pantothenátu až 2,99 g/l (24 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium, které bylo doplněno 5 g/l  $\beta$ -alaninu.

K tomu, aby byl schopen produkce pantothenátu bez přídavku  $\beta$ -alaninového prekursoru byly zaveden do kmene PA374 další kopie genu *panD* kódující aspartat- $\alpha$ -dekarboxylasu. Chromosomální DNA kmene PA401 byla zavedena do PA374. Selekcí tetracyklinem byl získán kmen PA377.

Výsledný kmen PA377 měl genotyp *P<sub>26</sub>panBCD*, *P<sub>26</sub>panE1*, *P<sub>26</sub>ilvBNC*, *P<sub>26</sub>ilvD*, *specR*, *tetR* a *trpC2* ( $\text{Trp}^-$ ).

S kmenem PA377 *Bacillus subtilis* byly dosaženy titry pantothenátu až 1,31 g/l (24 h) a 3,6 g/l (48 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium bez doplnění prekursorů, jako jsou  $\beta$ -alanin nebo  $\alpha$ -ketoisovalerat.

Příprava kmene PA401 *Bacillus subtilis* (genotyp *P<sub>26</sub>panD*) je popsána v následujícím odstavci.

Gen *panD* *Bacillus subtilis* byl klonován z operonu *panBCD* do plazmidového vektoru, který obsahoval tetracyklinový markerový gen. Proti směru exprese ke genu *panD* byl vložen promotor *P<sub>26</sub>* a výše popsané umělé RBS. Restrikčním enzymovým štěpením byl z vektoru připraven fragment, který obsahoval tetracyklinový markerový gen a gen *P<sub>26</sub>panD*. Fragment byl znovu ligován a převeden do výše popsaného kmene 221. Výsledný kmen PA401 je charakterizován genotypem *P<sub>26</sub>panBCD*, *P<sub>26</sub>panD*, *tetR* a *trpC2* ( $\text{Trp}^-$ ).

S kmenem PA401 *Bacillus subtilis* byly dosaženy titry pantothenátu až 0,3 g/l (24 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium, které bylo doplněno 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovalerátu. V 10

ml kultury v SVY-medium, které bylo doplněno 5 g/l kyseliny D-pantoové a 10 g/l L-aspartatu, byly dosaženy titry až 2,2 g/l (24 h).

Kmen PA377 byl transformován chromosomální DNA kmene PY79 pro vytvoření tryptofan prototrofického kmene. Výsledný kmen PA824 má genotyp  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  $P_{26}ilvBNC$ ,  $P_{26}ilvD$ ,  $specR$ ,  $tetR$  a  $Trp^+$ . S kmenem PA824 *Bacillus subtilis* byly dosaženy titry pantothenatu až 4,9 g/l (48 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium bez jakýchkoli přísad, jako jsou prekurzory.

Příprava kmene PA668 je popsána v následujícím odstavci:

Gen *Bacillus panB* byl klonován z operonu *panBCD* a zaveden do vektorového plazmidu, který obsahoval gen markeru pro chloramfenikol a sekvence *vpr* *B. subtilis*. Ve směru proti směru exprese byl zaveden silný konstitutivní promotor  $P_{26}$ . Zpracováním restrikčními enzymy byl vytvořen fragment obsahující gen  $P_{26}panB$ , chloramfenikolový marker a sekvenci *vpr*. Izolovaný fragment byl znovu ligována použit k transformaci kmene PA824. Výsledný kmen byl pojmenován PA668. Genotyp PA668 je  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  $P_{26}ilvBNC$ ,  $P_{26}ilvD$ ,  $P_{26}panB$ ,  $specR$ ,  $tetR$  a  $Trp^+$ . Byly izolovány dvě kolonie PA668, jedna z nich byla nazvána PA668-2A, druhá byla nazvána PA668-24.

S kmenem PA668-2A *Bacillus subtilis* byly dosaženy titry pantothenatu až 1,5 g/l (48 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium bez přísad látek jako jsou prekurzory. V 10 ml kultury v SVY-Medium, které bylo doplněno 10 g/l L-aspartatu, byly dosaženy titry pantothenatu až 5,0 g/l (48 h). V 10 ml kultur v médiu SVY-Medium, které bylo doplněno 5 g/l kyseliny D-pantoové a 10 g/l L-aspartatu bylo dosaženo titrů pantothenatu až 4,9 g/l (48 h).

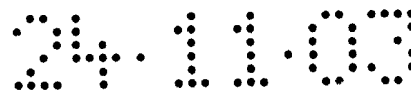
S kmenem PA668-24 *Bacillus subtilis* byly dosaženy titry pantothenátu až 1,8 g/l (48 h) v 10 ml kultury v médiu SVY-Medium bez přídavků látek jako jsou prekurzory. V 10 ml kultury v SVY-Medium, které bylo doplněno 10 g/l L-aspartátu, byly dosaženy titry pantothenátu až 4,9 g/l (48 h). V 10 ml kultur v médiu SVY-Medium, které bylo doplněno 5 g/l kyseliny D-pantoové a 10 g/l L-aspartátu bylo dosaženo titrů pantothenátu až 6,1 g/l (48 h).

Sekvence zde uvedeného promotoru P26 je následující:

```
gcctacctag cttccaagaa agatataccta acagcacaag agcggaaaga  
tgttttgttc tacatccaga acaacctctg ctaaaattcc tgaaaaattt  
tgcaaaaagt tgttgacttt atctacaagg tgtggtataa taatcttaac  
aacagcagga cgc.
```

Výše popsáný kmen PA377 byl testován v glukózou limitovaném fermentačním médiu SVY-Medium (25 g/l Difco Veal Infusion Broth, 5 g/l kvasničný extrakt Difco, 5 g/l tryptofanu, 5 g/l Na-glutamatu, 2 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l Na-citrátu, 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  a 1 ml/l roztoku stopových prvků (složení: 0,15 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 2,5 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,7 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , rozpuštěno ve vodě, konečný objem 1 l). Při fermentaci v 10 l za kontinuálního přívodu roztoku glukózy bylo dosaženo titrů pantothenátu 18 až 19 g/l (36 h) a 22 až 25 g/l (48 h).

PA824, tryptofanový protrofický derivát PA377, byl také testován v glukózou limitovaném fermentačním médiu YE-medium (10 g/l kvasničný extrakt Difco, 5 g/l Na-glutamatu, 8 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l Na-citrat, 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  a 1 ml/l výše uvedeného roztoku stopových prvků. Při fermentaci v 10 l za kontinuálního přívodu roztoku glukózy bylo



dosaženo titrů pantothenatu 20 g/l (36 h) a 28 g/l (48 h) a 36 g/l (72 h).

PA824 byl dále testován v glukózou limitované fermentaci ve vsádce média sestávající z 10 g/l kvasničného extraktu Difco, 10 g/l NZ Amine A (Quest International GmbH, Erfststadt, Německo), 10 g/l Na-glutamatu, 4 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l Na-citrátu, 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  a 1 ml/l výše uvedeného roztoku stopových prvků. Při fermentaci v 10 l za kontinuálního přívodu roztoku glukózy bylo dosaženo titrů pantothenatu 37 g/l (36 h) a 48 g/l (48 h).

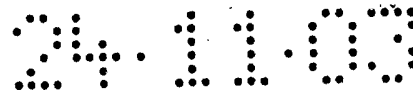
Tyto testovací fermentace jsou příkladem kmenů upravených k nadprodukcii pantothenatu spolu s produkcí pantothenatu zde popsaným způsobem nezávislým na prekurzorech.

Titry pantothenatu ve fermentačním médiu mohou být dále zvýšeny optimalizací nebo vývojem média, zvýšením doby fermentace, vylepšením a úpravou kmene a také kombinací těchto metod. Výše uvedené titry pantothenatu mohou být dosaženy fermentací kmeny, které jsou odvozeny od výše popsaných kmenů PA824 a PA668. Deriváty mohou být vyrobeny klasickým vývojem kmene, jako je klasická mutace a také aplikováním metod genového inženýrství. Prostřednictvím vylepšení média, kmene nebo metody mohou být zvýšeny titry ve fermentačním médiu na více než 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a více než 90 g/l.

Ekvivalenty: Odborník v oboru snadno zjistí nebo bude schopen odvodit za použití běžných experimentů mnoho ekvivalentů konkrétních provedení, která jsou zde popsána. Má se za to, že tyto ekvivalenty spadají do rozsahu následujících nároků.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob produkce sprejově sušitelné pantothenatové kompozice, **vyznačující se tím, že** zahrnuje kultivaci mikroorganismu produkujícího pantothenat za podmínek pH řízeného  $\text{Ca(OH)}_2$  tak, že je produkována sprejově sušitelná pantothenatová kompozice.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** uvedená sprejově sušitelná pantothenatová kompozice obsahuje Ca-D-pantothenat.
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** sprejově sušitelná pantothenatová kompozice má obsah sušiny asi 10 % až asi 80 %.
4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** sprejově sušitelná pantothenatová kompozice má obsah sušiny asi 20 % až asi 60 %.
5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** sprejově sušitelná pantothenatová kompozice má obsah sušiny vyšší než 50 %.
6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím, že** uvedená pantothenatová kompozice se dále zpracovává sprejovým sušením.
7. Způsob podle nároku 6, **vyznačující se tím, že** uvedená sprejově sušitelná pantothenatová kompozice se sprejově suší při teplotě na vstupu od asi 100 °C do asi 200 °C.



8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím, že** uvedená sprejově sušitelná pantothenatová kompozice se sprejově suší při teplotě na výstupu od asi 60 °C do asi 100 °C.
9. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím, že** biomasa se oddělí před sušením od uvedené sprejově sušitelné pantothenatové kompozice.
10. Způsob podle nároku 9, **vyznačující se tím, že** biomasa se oddělí od sprejově sušitelné pantothenatové kompozice filtrací, odstředěním, ultrafiltrací, mikrofiltrací nebo jejich kombinacemi.
11. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** uvedená sprejově sušitelná pantothenatová kompozice je zakoncentrována.
12. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** pH za uvedených podmínek pH řízeného  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  je mezi asi 6,0 a 11,0.
13. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** pH za uvedených podmínek pH řízeného  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  je asi 7,0.
14. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** pH za uvedených podmínek pH řízeného  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  je asi 10.
15. Sprejově sušitelná pantothenatová kompozice produkovaná způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14.