SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(22) Dátum podania prihlášky: **8. 9. 2001**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **100 46 490.4**
101 12 207.1

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **20. 9. 2000**
14. 3. 2001

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE, DE**

(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 8. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **8/2003**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP01/10386**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/24001**

(11), (21) Číslo dokumentu:

326-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7] :

A23K 1/16,
C12P 13/02

(71) Prihlasovateľ: **BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen, DE;**

(72) Pôvodca: **Müller Jürgen, Ludwigshafen, DE;**
Eichler Knut, Singapore, SG;

(74) Zástupca: **Žovicová Viera, Mgr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Prídavok do krmiva pre zvieratá, obsahujúci kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli, zlepšený spôsob jeho výroby a jeho použitie**

(57) Anotácia: –
Opísaný je prídavok do krmiva pre zvieratá, ktorý obsahuje voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli, a zlepšený spôsob jeho výroby, ako aj použitie prídavku do krmiva pre zvieratá v oblasti krmovinárstva.

SK 326-2003 A3

PP 326-03

Prídavok do krmiva pre zvieratá, obsahujúci kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli, zlepšený spôsob jeho výroby a jeho použitie

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka prídavku do krmiva pre zvieratá, ktorý obsahuje kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli, zlepšeného spôsobu jeho výroby a jeho použitia.

Doterajší stav techniky

Ako východiskový materiál pri biosyntéze koenzýmu A je D-pantotenát v rozsiahlej miere rozšírený v rastlinnej a živočíšnej oblasti. Na rozdiel od ľudí, ktorí konzumujú primerané množstvá kyseliny pantoténovej v potrave, bola však manifestácia nedostatku D-pantotenátu často opísaná ako u rastlín tak aj u zvierat. Dostupnosť D-pantotenátu je preto ekonomicky významná, predovšetkým v krmovinárskom priemysle.

D-pantotenát sa zvyčajne produkuje pomocou chemickej syntézy z D-pantolaktónu a β-alaninátu vápenatého (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th edition, 1999, Electronic release, kapitola "Vitamins"). Príprava D-pantolaktónu vyžaduje vypracovanie klasického racemátového štiepenia prostredníctvom diastereoizomérnych solí. Komerčným produktom, ktorý je výsledkom chemickej syntézy je zvyčajne vápenatá soľ kyseliny D-pantoténovej, D-pantotenát vápenatý.

V porovnaní s chemickou syntézou, výhodou biotechnologických metód produkcie, pri ktorých sa využívajú mikroorganizmy, je selektívna (enantiomérne čistá) príprava D- formy kyseliny pantoténovej, ktorú môžu zužitkovať vyššie organizmy. Vypracovanie racemátového štiepenia, ako nevyhnutného predpokladu pri chemickej syntéze, nie je teda nutné.

Sú známe mnohé fermentačné metódy na produkciu kyseliny D-pantoténovej s využitím mikroorganizmov, ktoré sú, okrem iného, opísané v patentových dokumentoch EP 0 590 857, WO 96/33283, US 6,013,492, WO 97/10340, DE 198 46 499, EP 1 001 027, EP 1 006 189, EP 1 006 192 a EP 1 006 193.

Anglický patentový dokument GB 598,177 opisuje prípravu kyseliny pantoténovej v množstve niekoľkých tisícin (parts per thousand, ppt), ako vedľajšieho produktu pri príprave 2,3-butylénglykolu s použitím *Aerobacter aerogenes*. Avšak zachytenie kyseliny pantoténovej je možné len s použitím adsorpcie na drevenom uhlí a následným vylúhovaním.

Európsky patentový dokument EP 1 006 189 opisuje spôsob prípravy pantotenátu, pri ktorom sa vo fermentačnom roztoku dosiahne maximálny obsah kyseliny D-pantoténovej 1 g/l. Takéto nízke obsahy kyseliny pantoténovej vo fermentačnom roztoku, t.j. menej ako 10 % hmotnostných, vztiahnuté na obsah pevných látok, nie sú však vhodné na komerčnú prípravu prídavkov do krmiva pre zvieratá, obsahujúcich kyselinu D-pantoténovú. Ďalšou nevýhodou do dnešných čias publikovaných spôsobov je to, že izolácia produktu z fermentačného média vyžaduje veľký počet krokov spracovania. Ekonomický spôsob produkcie pre priemyselnú výrobu nebol doteraz opísaný.

Americký patentový dokument US 6,013,492 opisuje spracovanie kyseliny D-pantoténovej z fermentačného roztoku odfiltrovaním nerozpustných zložiek, ako je napríklad bunkový materiál, z kultivačného média, adsorpciu filtrátu na aktívnom uhlí, následné eluovanie kyseliny D-pantoténovej s organickým rozpúšťadlom, výhodne s metanolom, neutralizáciu s použitím hydroxidu vápenatého a napokon kryštalizáciu vápenatej soli kyseliny D-pantoténovej. Značnou nevýhodou týchto krokov spracovania je ďalšia strata požadovaného produktu. Okrem toho, pre produkciu v priemyselnom merítku by bol potrebný prídavný systém na regeneráciu použitého rozpúšťadla. Ďalšou nevýhodou je vedľajšia produkcia veľkých množstiev odpadovej vody, ktorá samotná vyžaduje nákladné spracovanie alebo dokonca likvidáciu.

Nemecká patentová prihláška DE 100 16 321 A1 opisuje spôsob prípravy prídavkov do krmiva pre zvieratá, ktoré sa vyrábajú fermentáciou mikroorganizmov produkujúcich kyselinu D-pantoténovú. Avšak tento spôsob vyžaduje, aby sa po fermentácii pridali hydroxidy alebo oxidy alkalických kovov alebo kovov alkalických zemín.

Predmetom predloženého vynálezu je poskytnúť prídavok do krmiva pre zvieratá, ktorý obsahuje voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli, a ich príprava s použitím zlepšeného spôsobu, ktorý nevykazuje vyššie uvedené nevýhody.

Tento cieľ sa dá dosiahnuť výhodným spôsobom pomocou predloženého vynálezu.

Podstata vynálezu

Vynález sa týka spôsobu prípravy prídavku do krmiva pre zvieratá, ktorý obsahuje voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli, kde

a) organizmus produkujúci kyselinu D-pantoténovú sa fermentuje v kultivačnom médiu obsahujúcom najmenej jeden zdroj uhlíka a jeden zdroj dusíka, bez zavádzania ďalších prekurzorov a

b) fermentačný roztok obsahujúci kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli sa podrobí, bez uskutočnenia ďalších krokov spracovania, sušeniu a/alebo úprave.

Spôsob podľa predloženého vynálezu sa ďalej vyznačuje uskutočňovaním fermentácie, pokým sa nedosiahne obsah pevných látok najmenej 6 % hmotnostných, výhodne 7 až 25 % hmotnostných a/alebo obsah kyseliny D-pantoténovej najmenej 2 až 15 % hmotnostných, výhodne 4 až 15 % hmotnostných.

Fermentácia na tento účel sa môže uskutočňovať s použitím bežne známych postupov vsádzkovým procesom, procesom fed-batch alebo opakovaným fed-batch procesom alebo ako kontinuálny proces. Obsahom pevných látok sa pre účely predloženého vynálezu rozumie vysušený fermentačný roztok, ktorý okrem iného obsahuje vysušenú biomasu, minerály a D-pantotenát a/alebo jeho soli. Na stanovenie obsahu pevných látok sa pri sterilných podmienkach odoberie vzorka fermentačného roztoku a suší sa, napríklad vo vákuovej sušiarni pri teplote 120 °C počas 12 hodín.

Výhodou pri spôsobe podľa predloženého vynálezu v porovnaní so spôsobmi podľa doterajšieho stavu techniky je predovšetkým to, že fermentačný roztok sa nemusí podrobiť žiadnemu ďalšiemu spracovaniu, ako sú napríklad adsorpčné metódy na aktívnom uhlí, aby sa získal produkt, ktorý spĺňa požiadavky na požadovaný typ prídavku do krmiva pre zvieratá. Týmito požiadavkami sú napríklad relatívne vysoký obsah kyseliny D-pantoténovej a dobrá tolerovateľnosť pre cieľový organizmus a biologická hodnota v zmysle "vitamínového účinku" produktu podľa vynálezu, ktorá zodpovedá hodnote chemicky syntetizovanej kyseliny D-pantoténovej.

Stupeň čistoty samotnej kyseliny D-pantoténovej je potrebné v takomto prípade považovať za najmenej významný, pretože pri kŕmení zvierat sa vo väčšine prípadov zakomponuje do zložených krmív. Naproti tomu, za ďalšiu výhodu produktu podľa predloženého vynálezu je potrebné jednoznačne považovať to, pokiaľ ide o vyššie uvedený spôsob produkcie, že okrem kyseliny D-pantoténovej obsahuje ďalšie komponenty fermentačného roztoku, ktoré sú významnými pre pohodu zvierat, ako je napríklad relatívne vysoký obsah proteínu a (snáď esenciálnych) aminokyselín, minerálnych látok, vitamínov a ďalších zložiek, ktoré sa vhodne vylučujú do média v priebehu fermentácie.

Ďalšou výhodou spôsobu podľa predloženého vynálezu je vynechanie krokov spracovania fermentačného roztoku, za vzniku produktu s dobrou biologickou hodnotou. Spôsob podľa tohto vynálezu sa vyznačuje tým, že požadovaný materiál sa pripraví úplne bez použitia organických rozpúšťadiel. Okrem toho, množstvo vytvorenej odpadovej vody sa podľa predloženého vynálezu výrazne zníži. Toto má preto za následok ďalšie vynechanie krokov spracovania a systémov na likvidáciu. Spôsob podľa predloženého vynálezu sa teda vyznačuje výhodným postupom, ktorý je jednoduchší, menej závadný, časovo menej náročný, jednoznačne menej nákladný a teda ekonomicky výhodnejší ako konvenčné metódy.

Výraz "produkovať" znamená v súvislosti s predloženým vynálezom, že organizmus je schopný syntetizovať väčšie množstvá kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí, než ako je potrebné pre jeho vlastné metabolické požiadavky. Vo variante, ktorý je výhodným uskutočnením podľa predloženého vynálezu,

syntetizované množstvo kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí nie je prítomné vo vnútri buniek, ale ideálne sa celkom uvoľňuje z organizmu do kultivačného média. Táto exportácia sa môže uskutočňovať aktívne alebo pasívne prostredníctvom mechanizmov, ktoré sú dobre známe.

Organizmami produkujúcimi kyselinu D-pantoténovú, ktoré sa používajú podľa predloženého vynálezu sú mikroorganizmy. Tieto podľa predloženého vynálezu zahrňujú huby, kvasinky a/alebo baktérie. Podľa vynálezu je výhodné použite húb, ako sú napríklad *Mucor* alebo kvasiniek, ako sú napríklad *Saccharomyces* alebo *Debaromyces* a v takomto prípade výhodne *Saccharomyces cerevisiae*. Podľa predloženého vynálezu je výhodné použitie *Coryneform* baktérií alebo *Bacillaceae*. Podľa vynálezu sú výhodné napríklad, baktérie z rodu *Corynebacterium, Escherichia, Bacillus, Arthrobacter, Brevibacterium, Pseudomonas, Salmonella, Klebsiella, Proteus, Acinetobacter* alebo *Rhizobium*. Predovšetkým výhodnými príkladmi v tejto súvislosti sú *Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium breve* alebo *Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. amyloliquefaciens, B. cereus, B. lentimorbus, B. lentus, B. firmus, B. pantothenticus, B. circulans, B. coagulans, B. megaterium, B. pumilus, B. thuringiensis, B. brevis, B. stearothermophilus* a ďalšia skupina jedného druhu *Bacillus*, ktoré sú charakterizované svojou 16sRNA, alebo *Actinum mycetalis*. Tento zoznam je len na ilustráciu a v žiadnom prípade nie je obmedzením predloženého vynálezu.

Predložený vynález sa okrem toho týka použitia geneticky modifikovaných organizmov na produkciu prídavku do krmiva pre zvieratá podľa vynálezu, pričom tento prídavok obsahuje voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli. Takéto geneticky modifikované organizmy sa môžu izolovať napríklad pomocou chemickej mutagenézy a následnou selekciou prostredníctvom vhodnej "skríningovej metódy". Vynález zahrňuje tiež takzvané producentské kmene, ktoré sú vhodné na produkciu produktu na účely predloženého vynálezu a majú genetické modifikácie, pokiaľ ide o metabolický tok v smere D-pantoténovej kyseliny, taktiež zahrňujú modifikácie v súvislosti s exportáciou kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí cez bunkovú membránu.

Môžu sa tiež použiť transgénne organizmy, vytvorené transferom homológnych a/alebo heterológnych nukleotidových sekvencií, ktoré sú potrebné alebo môžu podporovať syntézu požadovaného produktu. Nadmerná expresia a/alebo deregulácia jedného alebo viacerých génov, samostatne a/alebo v kombinácii, lokalizovaného v genóme a/alebo na vektore, je v tejto súvislosti výhodná.

Takéto transgénne organizmy môžu výhodne obsahovať prídavné kópie a/alebo geneticky modifikované gény zvolené zo skupiny zahrňujúcej panB, panC, panD, panE a/alebo ich kombinácie a/alebo dokonca organizačné jednotky, ako je panBCD operón. Ďalšou možnosťou je výhodné ovplyvňovanie ich metabolických dráh, ako je napríklad izoleucínová-valínová biosyntetická dráha v organizmoch, ako je opísané napríklad v európskych patentových dokumentoch EP 1 006 189, EP 1 006 192, EP 1 006 193 alebo EP 1 001 027. Toto zvyšuje dostupnosť prekurzorových látok s rozvetveným reťazcom pre biosyntézu kyseliny pantoténovej. Je výhodné, aby sa, tam kde je vhodné, nadmerne exprimovali gény pre túto biosyntetickú dráhu, t.j. ilvB, ilvN, ilvC a/alebo ilvD.

Okrem toho sa predložený vynález týka genetických modifikácií aspartát-αdekarboxylázy (panD), napríklad nadmernej expresie a/alebo deregulácie, v použitom organizme produkujúcom kyselinu D-pantoténovú. Pri výhodnom spôsobe je β-alanín už prítomný v bunkách vo zvýšených koncentráciách, v porovnaní so zodpovedajúcimi geneticky nemodifikovanými organizmami a teda nie je potrebné ho pridávať do kultivačného média ako prekurzor, ako je uvedené v príkladoch európskej patentovej prihlášky EP-A-0 590 857. Výhodnými mikroorganizmami sú také mikroorganizmy, v ktorých je deregulovaná kyselina pantoténová (pan) a/alebo biosyntéza izoleucínu-valínu (ilv) a/alebo aspartát αdekarboxyláza (panD).

Prídavná nadmerná expresia ketopantoátreduktázy (panE) v mikro-organizmoch predstavuje ďalšiu výhodu.

Ďalej je tiež výhodné, aby sa tam kde je to vhodné, redukovala aktivita coaA génu, ktorý je potrebný na syntézu koenzýmu A, alebo (napríklad v druhoch *Bacillus*) sa úplne zamedzila. Je to z toho dôvodu, že *Bacillus* okrem coaA

obsahuje ďalší gén pre túto enzymatickú funkciu (= coaX). Aktivita tohto coaX génu alebo zodpovedajúceho enzýmu sa môže tiež modifikovať, výhodne redukovať, alebo dokonca deletovať, pokiaľ coaA samotný má ešte primeranú, i keď zníženú, enzymatickú aktivitu, t.j. enzymatická aktivita coaA sa úplne nestratila. Okrem nadmernej expresie rozličných génov genetická manipulácia promótorových regiónov týchto génov je taktiež výhodná, ak táto manipulácia vedie k nadmernej expresii génových produktov.

V jednom uskutočnení podľa predloženého vynálezu sa použili bakteriálne kmene opísané v prílohe (patentová prihláška PCT/US 0025993), samotné, ako napríklad PA 668 a/alebo jeho deriváty. Vo výhodnom uskutočnení spôsobu podľa predloženého vynálezu sa použil mikroorganizmus *Bacillus subtilis* PA 377, opísaný v prílohe (patentová prihláška PCT/US 0025993). Tento kmeň *Bacillus subtilis* PA 377 sa produkoval nasledovne:

Vychádzajúc z kmeňa *Bacillus subtilis* 168 (Marburg kmeň ATCC 6051), ktorý má genotyp *trpC2* (Trp^-), kmeň PY79 sa generoval transdukciou Trp^+ markera (z *Bacillus subtilis*, divoký typ W23). ΔpanB a ΔpanE1 mutácie sa zaviedli do kmeňa PY79 s použitím klasických metód genetickej manipulácie (ako je opísané napríklad v Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (editors), Molecular Biological Methods for *Bacillus* (1990) John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England).

Výsledný kmeň sa transformoval s genómovou DNA *Bacillus subtilis* kmeň PA221 (genotyp P_{26}*panBCD*, *trpC2* (Trp^-)) a genómovou DNA *Bacillus subtilis* kmeň PA303 (genotyp P_{26}*panE1*). Výsledný kmeň PA327 mal genotyp P_{26}*panBCD*, P_{26}*panE1* a je tryptofán-auxotrofný (Trp^-).

Titer kyseliny pantoténovej dosiahnutý s *Bacillus subtilis* kmeňom PA327 v 10 ml kultúrach s SVY médiom (25 g/l Difco teľací infúzny vývar, 5 g/l Difco kvasnicový extrakt, 5 g/l glutamát sodný, 2,7 g/l síran amónny doplnený do 740 ml vody, autoklávovanie, potom pridanie 200 ml 1 M fosforečnanu draselného, pH 7,0 a 60 ml 50 % sterilného roztoku glukózy), ktoré sa doplnilo s 5 g/l β-alanínu a 5 g/l α-ketoizovalerátu, predstavoval až do 3,0 g/l (24 hodín).

Produkcia kmeňa PA221 *Bacillus subtilis* (genotyp P_{26}*panBCD, trpC2* (Trp$^-$)) je opísaná v nasledujúcom odseku:

Použili sa klasické metódy genetického inžinierstva na klonovanie *panBCD* operónu *Bacillus,* pričom sa vychádzalo z *Bacillus subtilis* GP275 plazmidovej knižnice s pridaním sekvenčnej informácie *panBCD* operónu *E. coli* (pozri Merkel a kol., FEMS Microbiol. Lett., 143, 1996, 247 – 252). *E. coli* kmeň BM4062 (bir^{ts}) a informácie, že *Bacillus* operón je umiestnený v susednej oblasti *birA* génu sa použili na klonovanie. *panBCD* operón sa zaviedol do plazmidu, ktorý bol schopný sa replikovať v *E. coli.* Na zlepšenie expresie *panBCD* operónu sa použili silné, konštitutívne promótory *Bacillus subtilis* fágu SP01 (P_{26}) a ribozómové väzbové miesto (= RBS) pred *panB* génom sa nahradilo umelým RBS. Fragment DNA umiestnený bezprostredne v smere natívneho *panB* génu v *Bacillus* sa ligoval pred P_{26}*panBCD* kazetu na plazmid. Tento plazmid sa transformoval do *Bacillus subtilis* kmeň RL-1 (derivát *Bacillus subtilis* 168 (Marburg kmeň ATCC 6051), genotyp *trpC2* (Trp$^-$)) získaný klasickou mutagenézou), a natívny *panBCD* operón sa nahradil p_{26}panBCD operónom s použitím homológnej rekombinácie. Výsledný kmeň sa nazval PA221 a má genotyp P_{26}*panBCD*, *trpC2* (Trp$^-$).

Titer kyseliny pantoténovej dosiahnutý s *Bacillus subtilis* kmeň PA221 v 10 ml kultúrach s SVY médiom, ktoré sa doplnilo s 5 g/l β-alanínu a 5 g/l α-ketoizovalerátu, predstavoval až do 0,92 g/l (24 hodín).

Produkcia *Bacillus subtilis* kmeň PA303 (genotyp P_{26}*panE1*) je opísaná v nasledujúcom odseku:

Sekvencia *Bacillus panE* sa klonovala analogicky pomocou *E. coli panE* génovej sekvencie. Zistilo sa, že v *B. subtilis* existujú dva homológy *panE* génu *E. coli*, ktoré sa označili ako *panE1* a *panE2*. Delečné analýzy ukázali, že *panE* gén je zodpovedný za 90 % produkcie kyseliny pantoténovej, zatiaľ čo delécia *panE2* génu nemá žiaden signifikatný účinok na produkciu kyseliny pantoténovej. Znova, v analógii ku klonovaniu *panBCD* operónu, promótor sa nahradil silným konštitutívnym promótorom P_{26}, a ribozómové väzbové miesto pred *panE1* génom sa nahradilo umelým väzbovým miestom. Fragment P_{26}*panE1* sa klonoval do vektora označeného tak, že P_{26}*panE1* fragment bol schopný integrovať do

pôvodného *panE1* lokusu v genóme *Bacillus subtilis*. Kmeň, ktorý sa vytvoril po transformácii a homológnej rekombinácii sa nazval PA303 a má genotyp P_{26}*panE1*.

Titer kyseliny pantoténovej dosiahnutý s *Bacillus subtilis* kmeň PA303 v 10 ml kultúrach s SVY médiom doplneným s 5 g/l β-alanínu a 5 g/l αketoizovalerátu predstavoval až do 1,66 g/l (24 hodín).

Ďalšia konštrukcia kmeňa sa uskutočnila pomocou transformácie PA327 s plazmidom, ktorý obsahoval P_{26}*ilvBNC* operón a spektinomycínom značený gén. Operón P_{26}*ilvBNC* sa integroval do lokusu *amyE*, čo sa demonštrovalo pomocou PCR. Jeden transformant sa nazval PA340 (genotyp P_{26}*panBCD*, P_{26}*panE1*, P_{26}*ilvBNC*, specR, *trpC2* (Trp^-)).

Titer kyseliny pantoténovej dosiahnutý s *Bacillus subtilis* kmeň PA340 v 10 ml kultúrach s SVY médiom, ktoré bolo doplnené len s 5 g/l β-alanínu, predstavoval až do 3,6 g/l (24 hodín), a titer v 10 ml kultúrach s SVY médiom doplnenom s 5 g/l β-alanínu a 5 g/l αketoizovalerátu predstavoval až do 4,1 g/l (24 hodín).

Okrem toho sa deregulovaná *ilvD* kazeta zaviedla do kmeňa PA340. Toto sa uskutočnilo transformáciou plazmidu, ktorý obsahuje *ilvD* gén za regulácie P_{26} promótora s umelým RBS2 do PA340. V takomto prípade sa P_{26}*ilvD* gén integroval pomocou homológnej rekombinácie do pôvodného lokusu *ilvD*. Výsledný kmeň PA374 predstavuje genotyp P_{26}*panBCD*, P_{26}*panE1*, P_{26}*ilvBNC*, P_{26}*ilvD*, specR a *trpC2* (Trp^-).

Titer kyseliny pantoténovej dosiahnutý s *Bacillus subtilis* kmeň PA374 v 10 ml kultúrach s SVY médiom, ktoré bolo doplnené len s 5 g/l β-alanínom, predstavoval až do 2,99 g/l (24 hodín).

Aby sa produkovala kyselina pantoténová s kmeňom PA374 bez dodávania β-alanínu, do kmeňa PA374 sa zaviedli ďalšie kópie génu *panD*, ktorý kóduje aspartát-αdekarboxylázu. Toto sa uskutočnilo transformovaním chromozomálnej DNA kmeňa PA401, ktorý je opísaný nižšie, do PA374. Kmeň PA377 sa získal tetracyklínovou selekciou.

Výsledný kmeň PA377 mal genotyp P_{26}*panBCD*, P_{26}*panE1*, P_{26}*ilvBNC*, P_{26}*ilvD*, specR, tetR a *trpC2* (Trp^-).

Titer kyseliny pantoténovej dosiahnutý s *Bacillus subtilis* kmeň PA377 v 10 ml kultúrach s SVY médiom bez dodávania prekurzora predstavoval až do 1,31 g/l (24 hodín).

Produkcia *Bacillus subtilis* kmeň PA401 (genotyp P_{26}*panD*) je opísaná v nasledujúcej časti:

Bacillus subtilis panD géne sa klonoval z *panBCD* operónu do vektora, ktorý poskytuje tetracyklínový značkový gén. Promótor P_{26} a umelý RBS, opísaný vyššie, sa klonovali pred *panD* génom. Fragment obsahujúci tetracyklínový značkový gén a P_{26}*panD* gén sa produkovali reštrikčnou digesciou. Tento fragment sa opätovne ligoval a transformoval do kmeňa PA221, opísaného vyššie. Fragment sa integroval do genómu kmeňa PA211. Výsledný kmeň PA401 mal genotyp P_{26}*panBCD*, P_{26}*panD*, tetR a *trpC2* (Trp^-).

Titer kyseliny pantoténovej dosiahnutý s *Bacillus subtilis* kmeň PA401 v 10 ml kultúrach s SVY médiom, ktoré sa doplnilo s 5 g/l α-ketoizovalerátu predstavoval až do 0,3 g/l (24 hodín). Titer kyseliny pantoténovej dosiahnutý v 10 ml kultúrach s SVY médiom doplnenom s 5 g/l kyseliny D-pantoovej a 10 g/l L-aspartátu predstavoval až do 2,2 g/l (24 hodín).

Exaktná konštrukcia kmeňov sa dá nájsť v prílohe medzinárodnej patentovej prihlášky PCT/US 0025993.

S kmeňom PA377, ktorý je opísaný vyššie sa pri glukózou-limitovanej fermentácii v SVY médiu (25 g/l Difco teľacieho infúzneho vývaru, 5 g/l Difco kvasnicového extraktu, 5 g/l tryptofánu, 5 g/l glutamátu sodného, 2 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 10 g/l KH_2PO_4, 20 g/l K_2HPO_4, 0,1 g/l $CaCl_2$, 1 g/l $MgSO_4$, 1 g/l citrátu sodného, 0,01 g/l $FeSO_4$*7 H_2O a 1 ml/l roztoku stopových solí s nasledujúcim zložením: 0,15 g $Na_2MoO_4 \times 2$ H_2O, 2,5 g H_3BO_3, 0,7 g $CoCl_2 \times 6$ H_2O, 0,25 g $CuSO_4 \times 5$ H_2O, 1,6 g $MnCl_2 \times 4$ H_2O, 0,3 g $ZnSO_4 \times 7$ H_2O, doplnenom do 1 l s vodou)) na 10 l systéme s kontinuálnym dodávaním roztoku glukózy dosiahli koncentrácie

kyseliny pantoténovej vo fermentačnom vývare 18 až 19 g/l (22 až 25 g/l) v priebehu 36 hodín (48 hodín).

Vyvinutím média, kmeňov a fermentačných metód je možné zvýšiť titre kyseliny pantoténovej vo fermentačnom vývare na viac ako 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l.

Významnou výhodou spôsobu podľa predloženého vynálezu je to, že fermentácia sa uskutočňuje v kultivačnom médiu, ktoré okrem najmenej jedného zdroja uhlíka a zdroja dusíka, neobsahuje ako východiskové zlúčeniny žiadne ďalšie prekurzory. To znamená, že biosyntéza kyseliny D-pantoténovej nezávisí od dodávania ďalších prekurzorov. Takýmito prekurzormi sa podľa predloženého vynálezu mienia látky, ako je napríklad β-alanín a/alebo L-aspartát a/alebo L-valín a/alebo α-ketoizovalerát a/alebo ich kombinácie.

Vo výhodnom variante spôsobu podľa tohto vynálezu sa fermentácia organizmov produkujúcich kyselinu D-pantoténovú uskutočňuje v kultivačnom médiu, ktoré obsahuje najmenej jeden zdroj uhlíka a jeden zdroj dusíka ako prekurzor, ale do média sa nedodáva žiaden β-alanín. Nezávislosť od dodávania prekurzorov predstavuje predovšetkým významnú ekonomickú výhodu spôsobu podľa predloženého vynálezu v porovnaní so známymi metódami, pretože mnohé prekurzory sú veľmi drahé.

Príkladmi zdrojov uhlíka, ktoré sú podľa predloženého vynálezu vhodné na použitie v kultivačnom médiu na fermentáciu vyššie uvedených organizmov sú sacharidy, ako sú hydrolyzáty škrobu (mono-, di-, oligosacharidy), výhodne glukóza alebo sacharóza, a melasa cukrovej repy alebo melasa cukrovej trstiny, proteíny, hydrolyzáty proteínov, sójová múčka, kukuričný výluh, tuky, voľné mastné kyseliny, recyklované bunky z prv uskutočnených fermentácií alebo ich hydrolyzáty, a kvasnicový extrakt. Tento výpočet nie je pre predložený vynález limitujúcim a taktiež nie sú limitujúcimi nasledujúce príklady vhodných zdrojov dusíka, ako je amoniak, síran amónny, močovina, proteíny, hydrolyzáty proteínov alebo kvasnicový extrakt. Fermentačné médium prídavne obsahuje minerálne soli a/alebo stopové prvky, ako aj aminokyseliny a vitamíny. Presné zloženie mnohých

vhodných fermentačných médií je dostupné a pre odborníkov skúsených v odbore známe.

Po naočkovaní fermentačného média s vhodným organizmom produkujúcim kyselinu D-pantoténovú, s hustotami buniek, ktoré sú pre odborníkov skúsených v odbore známe, sa organizmus kultivuje prípadne s pridaním odpeňovacieho činidla. Fermentácia sa podľa predloženého vynálezu uskutočňuje takým spôsobom, že pri ukončení obsah pevných látok vysušeného fermentačného roztoku predstavuje najmenej 6 % hmotnostných a obsah voľnej kyseliny D-pantoténovej predstavuje najmenej 2 % hmotnostné, výhodne najmenej 4 % hmotnostné. Na tento účel sa fermentácia môže uskutočňovať vsádzkovým procesom, procesom fed-batch alebo opakovaným fed-batch procesom, pričom sa dávkuje do zdroja uhlíka, alebo sa uskutočňuje kontinuálne. Teplota fermentácie predstavuje 10 až 70 °C, výhodne 20 až 50 °C. Fermentor sa prevzdušňuje s kyslíkom, vzduchom alebo so zmesami s dusíkom alebo ďalšími inertnými plynmi. Hodnota pH sa adjustuje na hodnotu v rozsahu 4 až 8, výhodne 5 až 7,5, a prípadne sa reguluje pridávaním vhodných zásad a/alebo kyselín.

Spôsob podľa predloženého vynálezu sa ďalej výhodne vyznačuje tým, že celkový obsah sacharidov je na konci fermentácie znížený na minimum, inak povedané, toto by bránilo neskoršiemu sušeniu a/alebo formulácii fermentačného roztoku vplyvom adhézie. Toto sa dá podľa predloženého vynálezu dosiahnuť pokračujúcou fermentáciou počas ešte určitej doby po spotrebovaní zdroja uhlíka (pri kultivácii vo vsádzkovom procese) alebo potom, ako sa prívod uhlíka (v procese uskutočňovanom ako fed-batch proces alebo pri opakovanom fed-batch procese) zastavili a/alebo sa reguloval tak, že koncentrácia zdroja uhlíka je v skutočnosti nulová (v prípade fed-batch procesu, opakovaného fed-batch procesu alebo kontinuálneho uskutočňovania procesu).

Toto sa podľa predloženého vynálezu uskutočňuje tak, že vo fermentácii sa pokračuje po zastavení dávkovania zdroja uhlíka (napríklad roztoku sacharidu), až pokým koncentrácia rozpusteného kyslíka (pO_2) nedosiahne najmenej 80 %, výhodne 90 % a predovšetkým výhodne 95 % hodnoty nasýtenia vo fermentačnom roztoku.

Pre spôsob podľa predloženého vynálezu je ďalej dôležité, aby sa fermentačný roztok mohol podrobiť sušeniu a/alebo úprave bez uskutočnenia ďalších krokov spracovania. To znamená, že komplikované kroky spracovávania na izolovanie požadovaného produktu obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú z fermentačného roztoku, ako je napríklad prečistenie pomocou adsorpcie na aktívnom uhlí, nie sú potrebné. Odstránenie biomasy z fermentačného roztoku nie je tiež celkom absolútne nevyhnutné, pretože obsah proteínu v produkte podľa vynálezu, t.j. v prídavku do krmiva pre zvieratá obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú, môže byť obsah proteínu až do 50 % hmotnostných.

Sušenie a/alebo formulovanie fermentačného roztoku sa uskutočňuje s použitím postupov, ktoré sú dobre známe, ako je napríklad sušenie rozprašovaním, granulácia rozprašovaním, fluidné sušenie, fluidná granulácia, sušenie v bubnovej sušičke alebo bleskové odstredivé sušenie (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th edition, 1999, Electronic release, kapitola "Drying of Solid Materials"). Teplota privádzaného plynu pri konvenčnom sušení je v rozsahu 100 až 280 °C, výhodne predstavuje 120 až 210 °C. Teplota odchádzajúceho plynu je v rozsahu 50 až 180 °C, výhodne 60 až 150 °C. Na dosiahnutie požadovanej distribúcie veľkosti častíc a s tým spojených vlastností produktu sa jemné častice môžu odstrániť a recyklovať. Taktiež hrubý materiál sa môže zomlieť v mlyne a tiež sa následne recyklovať. Produkt podľa predloženého vynálezu má napríklad béžovú až hnedú farbu. Okrem toho obsahuje tiež zvyškový obsah vody menej ako 5 % hmotnostných, výhodne 1 až 3 % hmotnostné a predovšetkým výhodne 0,5 až 2 % hmotnostné. Aby sa zabránilo aglomerácii produktu, obsah vody by nemal prekročiť 5 % hmotnostných. Schematický blokový diagram postupu výroby vyššie uvedeného spôsobu je znázornená na obrázku 1.

V jednom variante vyššie uvedeného spôsobu podľa predloženého vynálezu sušeniu a/alebo formulácii fermentačného roztoku predchádza, ak je to potrebné, odstránenie biomasy z fermentačného roztoku. Toto odstránenie sa môže byť v skutočnosti úplné alebo len čiastkové. Čiastočné odstránenie biomasy je výhodné, pričom je možné týmto znížiť obsah proteínu pod 10 % hmotnostných. Na dosiahnutie skutočne úplného odstránenia biomasy sa obsiahnuté pevné látky môžu odstrániť z vodnej kvapaliny napríklad centrifúgovaním. Vztiahnuté na

vysušený finálny produkt, v ďalšom variante podľa predloženého vynálezu sa obsah proteínu môže dokonca upraviť na menej ako 5 % hmotnostných. Odstránená biomasa sa môže výhodne využiť na kompenzáciu prirodzených variácií obsahu kyseliny D-pantoténovej vo fermentačných roztokoch z rozličných vsádzok produkcie, ktoré sa vyskytujú v rozpätí určitých rozsahov tolerancie. Napríklad po odstránení biomasy z viacerých rozličných vsádzok sa produkt môže doplniť s obsahom kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí, ktoré potom môžu zostať konštantné pri pokračujúcom pridávaní prv odstránenej biomasy. Toto zaručuje produkt, ktorý vykazuje reprodukovateľne konštantnú kvalitu.

V ďalšom uskutočnení spôsobu podľa predloženého vynálezu sa môže pred sušením a/alebo formulovaním fermentačného roztoku a, ak je to potrebné, po odstránení biomasy, fermentačný roztok zahustiť, aby sa zvýšil obsah pevných látok obsahujúcich kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli. Toto sa môže dosiahnuť napríklad odstránením vody odparením, ktoré sa z ekonomických dôvodov môže uskutočňovať, tam kde je to vhodné, viacstupňovým procesom a môže sa (aby sa zabránilo poškodeniu produktu) uskutočňovať pri atmosferickom tlaku alebo tiež vo vákuu. Ďalšou možnosťou je použitie membránovej metódy. V takomto prípade sa môžu tiež napríklad použiť metódy, ako je nanofiltrácia a/alebo reverzná osmóza. Zahustenie sa môže uskutočniť pri obsahu kyseliny D-pantoténovej od 20 do 50 % hmotnostných. Voda sa tiež môže, tam kde je to vhodné, súbežne recyklovať do fermentačného procesu. Toto výhodným spôsobom znižuje množstvo produkovaných odpadových vôd, teda výrazne znižuje náklady na spracovanie odpadových vôd. Toto je zobrazené na diagrame na obrázku 2.

Vo výhodnom uskutočnení podľa predloženého vynálezu sa odstránenie biomasy a zahustenie zostávajúceho fermentačného roztoku kombinuje, ak je to vhodné, so súčasným recyklovaním vody. Zobrazenie na blokovom diagrame postupu výroby je uvedené na obrázku 3.

Na tento účel sa môže, pre účely nastavenia konštantného obsahu cieľovej látky v produkte pri spôsobe podľa vynálezu, odstrániť biomasa alebo jej časť, napríklad separáciou, centrifúgovaním, ultrafiltráciou, mikrofiltráciou alebo hĺbkovou filtráciou alebo ich kombináciami, po ukončení fermentácie. Biomasa získaná týmto spôsobom sa môže znova podrobiť ďalšiemu odstráneniu vlhkosti s použitím

dekantačnej nádoby. Čira látka odtekajúca z dekantačnej nádoby sa potom znova vráti na vstup separátora. Odstránenie buniek umožňuje zvýšiť obsah kyseliny D-pantoténovej v produkte alebo upraviť obsah na konštantnú hodnotu, kedy sa rozličné frakcie spoločne zmiešajú tak, že premenlivé obsahy z fermentácie sa tiež môžu bez problémov spracovať. Potom sa môže uskutočniť ďalšie zahustenie fermentačného roztoku. Obsahy, vztiahnuté na voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli, predstavujú 20 až 95 % hmotnostných, výhodne 30 až 90 % hmotnostných. Predovšetkým výhodné je, ak výsledný produkt má vysoký obsah voľnej kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí, a to 60 až 80 % hmotnostných a predovšetkým výhodne viac ako 80 % hmotnostných.

V ďalších variantoch spôsobu podľa predloženého vynálezu je možné, aby sa pred sušením a/alebo formulovaním fermentačného roztoku uskutočnil najmenej jeden z nasledujúcich krokov, zahrňujúcich

1) lýzu a/alebo usmrtenie biomasy a/alebo

2) odstránenie biomasy z fermentačného roztoku a/alebo

3) pridanie ďalších prísad a/alebo

4) zahustenie fermentačného roztoku, výhodne odstránením vody a, ak je to vhodné, súčasné recyklovanie vody do fermentačného procesu a/alebo

5) kombinácie krokov 1) až 4).

Predložený vynález sa teda týka tiež spôsobu, pri ktorom sa uskutočňuje lýza a/alebo usmrtenie biomasy buď ešte vo fermentačnom roztoku alebo až po odstránení biomasy z fermentačného roztoku. Toto sa môže uskutočňovať napríklad pomocou tepelného spracovania, výhodne pri teplote 80 až 200 °C a/alebo pomocou spracovania s kyselinou, výhodne s kyselinou sírovou alebo kyselinou chlorovodíkovou a/alebo enzymaticky, výhodne s lyzozýmom. Blokový diagram postupu je znázornený na obrázku 4.

Ďalšie uskutočnenie spôsobu podľa vynálezu opisuje postup, pri ktorom sa pred zahustením a/alebo pred úpravou k fermentačnému roztoku pridajú ďalšie prísady a/alebo ich zmesi, aby sa nastavil rovnomerný obsah kyseliny D-

pantoténovej a/alebo aby sa zlepšili vlastnosti produktu, ako je rozprašovanie, vlastnosti tečenia, sorpčná kapacita vo vode a stabilita počas skladovania. Príkladmi takýchto prísad a/alebo ich zmesí môžu byť na látky báze sacharidov, ako je napríklad laktóza alebo maltodextrín, na báze obilných produktov alebo strukovinových produktov, ako sú napríklad mleté kukuričné šúľky, pšeničné otruby a sójová múčka, na báze minerálnych solí, ako sú okrem iného vápenaté, horečnaté, sodné a draselné soli, a taktiež samotná kyselina D-pantoténová alebo jej soli (soľ kyseliny D-pantoténovej pripravená chemicky alebo pomocou fermentácie). Pridávanie sa môže uskutočňovať pred sušením a/alebo počas granulácie alebo samotného kroku úpravy. Toto je zobrazené sumárne na obrázku 5.

V ďalšom variante podľa predloženého vynálezu sa D-pantotenát vápenatý produkuje pridaním vápenatých solí v kroku, ktorý sa pri spôsobe podľa predloženého vynálezu uskutočňuje čo najneskôr, t.j. výhodne pred a/alebo počas spracovania fermentačného roztoku, t.j. pred a/alebo počas zahustenia a/alebo sušenia a/alebo úpravy fermentačného roztoku (pozri obrázok 5). V tomto prípade sa obsah vápnikových iónov upraví pridávaním vápnikových solí tak, aby bol prítomný približne 1 mól vápenatej soli na 2 móly kyseliny D-pantoténovej vo upravenom finálnom produkte. Navyše je možné a výhodné, aby sa zohľadnil obsah vápenatých iónov, ktoré sú prítomné vo fermentačnom roztoku. Vápenatými zlúčeninami, ktoré sa môžu použiť, sú napríklad oxid vápenatý, hydroxid vápenatý, hydrogenfosforečnan vápenatý, uhličitan vápenatý, síran vápenatý, chlorid vápenatý a/alebo ďalšie vápenaté soli.

Predložený vynález sa teda týka tiež spôsobu, pri ktorom sa, vztiahnuté na obsah kyseliny D-pantoténovej v upravenom produkte, 1 mól vápenatých iónov pridá na 2 móly kyseliny D-pantoténovej, pričom tieto sa pridajú vo forme vápenatej soli ako prísady pred a/alebo počas zahustenia, sušenia a/alebo formulovania.

Ďalšou možnosťou v inom spôsobe podľa predloženého vynálezu je, prostredníctvom zloženia fermentačného média a v tejto súvislosti predovšetkým výberu minerálnych solí so špecifickým katiónom, produkovanie produktu, ktorý obsahuje zvýšené množstvo zvolenej soli kyseliny D-pantoténovej. Napríklad je možné, použitím tlmivého roztoku hydrogenfosforečnanu dvojdraselného/dihydrogen-

fosforečnanu draselného dokonca v priebehu fermentácie produkovať produkt, ktorý obsahuje draselnú soľ kyseliny D-pantoténovej. Príkladmi vhodných solí sú vápenaté, draselné, horečnaté, sodné alebo amónne soli kyseliny D-pantoténovej alebo akékoľvek ich zmesi. Blokový diagram postupu je zobrazený na obrázku 6.

Podľa predloženého vynálezu je tiež možné voľne kombinovať všetky vyššie uvedené varianty a postupy, zobrazené na obrázkoch 1 až 6.

Predložený vynález sa ďalej týka prídavku do krmiva pre zvieratá, ktorý sa produkuje jedným z vyššie opísaných spôsobov, na báze fermentačného roztoku získaného fermentáciou najmenej jedného organizmu produkujúceho kyselinu D-pantoténovú, pričom tento prídavok obsahuje prinajmenšom voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli v koncentrácii najmenej 30 až 95 % hmotnostných, celkový obsah sacharidov predstavuje 0,1 až 15 % hmotnostných a obsah proteínu je menej ako 5 až 50 % hmotnostných, vztiahnuté na sušinu.

Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa predloženého vynálezu sa vyznačuje tým, že obsahuje 50 až 95 % hmotnostných, výhodne 70 až 95 % hmotnostných, predovšetkým výhodne 60 až 80 % hmotnostných a najvýhodnejšie viac ako 80 % hmotnostných voľnej kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí.

Nespracovaný fermentačný roztok ako základ pre prídavok do krmiva pre zvieratá obsahuje podľa predloženého vynálezu najmenej 10 g/l, výhodne najmenej 20 g/l a predovšetkým výhodne najmenej 40 g/l kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí.

Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa predloženého vynálezu môže ďalej obsahovať vápenaté, draselné, horečnaté, sodné a/alebo amónne soli kyseliny D-pantoténovej a/alebo ich zmesi.

Špecifický variant prídavku do krmiva pre zvieratá podľa predloženého vynálezu sa vyznačuje zložením sušiny, ktorá obsahuje najmenej nasledujúce komponenty:

a) voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli	najmenej 30 až 95 % hmotnostných
b) proteíny	maximálne 50 % hmotnostných

c) celkové sacharidy	maximálne 15 % hmotnostných
d) minerálne látky	maximálne 20 % hmotnostných

Prídavok do krmiva pre zvieratá môže podľa predloženého vynálezu mať obsah proteínu maximálne 50 % hmotnostných ako horný limit a ako spodný limit menej ako 10 % hmotnostných, výhodne menej ako 7 % hmotnostných a predovšetkým výhodne menej ako 5 % hmotnostných. Celkový obsah sacharidov v prídavku do krmiva pre zvieratá predstavuje maximálne približne 15 % hmotnostných a môže obsahovať ako dolný limit menej ako približne 0,1 % hmotnostných, pričom sa uvažujú všetky medzistupne. Pokiaľ ide o obsah vody, produkt obsahujúci kyselinu D-pantoténovú sa podľa predloženého vynálezu vyznačuje tým, že zvyškový obsah vody je menej ako 5 % hmotnostných, výhodne 1 až 3 % hmotnostné a predovšetkým výhodne 0,5 až 2 % hmotnostné.

Predložený vynález sa v ďalšom týka prídavku do krmiva pre zvieratá, ktorý obsahuje neaktívne, živé a/alebo životaschopné organizmy produkujúce kyselinu D-pantoténovú. Týmito sú výhodne mikroorganizmy, výhodne huby, kvasinky a/alebo baktérie. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa predloženého vynálezu predovšetkým výhodne obsahuje neaktívne, živé alebo životaschopné huby rodu *Mucor*, kvasinky rodu *Saccharomyces* a/alebo baktérie *Enterobacteriaceae*, ako je *E. coli*, *Salmonellae*, ako je *Salmonella typhimurium, Proteus vulgaris*, *Pseudomonas*, ako je *Pseudomonas matophila*, *Bacillaceae*, ako je *Bacillus subtilis* alebo *Bacillus cereus*, *Coryneform*, ako je *Corynebacterium glutamicum* alebo *Brevibacterium breve* a/alebo *Actinum mycetalis* a/alebo ich zmesi. Mimoriadne výhodnými sú baktérie rodu *Bacillus* a v tomto prípade druh *Bacillus subtilis*. Vynález zahrňuje tiež geneticky modifikované a/alebo transgénne organizmy a/alebo produkčné kmene vhodné na produkciu prídavkov do krmiva pre zvieratá. Predchádzajúci zoznam je v tejto súvislosti nelimitujúcim pre spôsob podľa predloženého vynálezu.

Vynález sa ďalej týka prídavku do krmiva pre zvieratá, pričom tento prídavok obsahuje ďalšie prísady, výhodne na báze sacharidov a/alebo obilnín a/alebo strukovín a/alebo minerálnych solí a/alebo (oddelene produkovaných chemicky

a/alebo pomocou fermentácie) kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli a/alebo ich zmesi.

Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa predloženého vynálezu je ďalej charakterizovaný formulovaním so zdanlivou hustotou od 0,35 do 0,7 kg/l, výhodne 0,4 až 0,6 kg/l. Okrem toho podľa predloženého vynálezu je stredný priemer častíc v rozsahu 10 až 2 000 µm, výhodne 20 až 1 500 µm, predovšetkým výhodne 25 až 1 000 µm a najvýhodnejšie 30 až 800 µm. Má béžovú až hnedú farbu. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa predloženého vynálezu môže byť vo forme prášku, granúl, peliet, ktoré sú vybavené poťahom ("poťahované") a/alebo ich kombinácií. Formulácia prídavku do krmiva pre zvieratá podľa predloženého vynálezu, napríklad pomocou zlúčenín na poťahovanie, slúži napríklad na zlepšenie vlastností produktu, ako je rozprašovanie, vlastnosti tečenia, sorpčná kapacita vo vode a stabilita počas skladovania.

Predložený vynález sa ďalej týka použitia prídavku do krmiva pre zvieratá, ktorý má vyššie opísané vlastnosti, ako doplnku do krmiva pre zvieratá a/alebo do krmných prídavkov pre zvieratá.

Nasledujúce príklady slúžia na ilustráciu predloženého vynálezu, ale v žiadnom prípade neznamenajú jeho obmedzenie.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Produkcia fermentačného roztoku obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú s *B. subtilis*

Do laboratórneho fermentora s kapacitou 14 l a s miešadlom a zavádzaním plynu sa zaviedlo vodné fermentačné médium s nasledujúcim zložením:

Kvasnicový extrakt	20 g/l
Tryptofán	5 g/l
Síran amónny	2 g/l
Glutamát sodný	5 g/l

Po sterilizácii sa prídavne pridali nasledujúce zložky média:

KH_2PO_4	10 g/l
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	20 g/l
Glukóza	10 g/l
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	1 g/l
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0,1 g/l
Citrát sodný	1 g/l
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,01 g/l
Roztok stopových solí	6 ml/l

Roztok stopových solí mal nasledujúce zloženie:

0,15 g $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$, 2,5 g H_3BO_3, 0,7 g $CoCl_2 \times 6\ H_2O$, 0,25 g $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, 1,6 g $MnCl_2 \times 4\ H_2O$, 0,3 g $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$ sa doplnilo do 1 litra s vodou.

Roztok stopových solí sa pridáva prostredníctvom sterilnej filtrácie. Počiatočný objem kvapaliny predstavuje 6 litrov. Obsahy, ktoré sú uvedené vyššie, sú vztiahnuté na túto hodnotu.

K tomuto roztoku sa pridalo 60 ml inokulačnej kultúry (OD_{600} = 9,5) *Bacillus subtilis* PA377, roztok sa potom fermentoval pri teplote 37 °C, pri 200 otáčkach za minútu (rpm) a pri aeračnej rýchlosti 12 l/min. Tento kmeň je opísaný v prílohe medzinárodnej patentovej prihlášky PCT/US 0025993.

V priebehu 72 hodín sa nadávkovalo 4,5 litra sterilného vodného roztoku. Zloženie bolo nasledujúce:

Glukóza	400 g/l
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0,4 g/l
Kvasnicový extrakt	25 g/l

Počas fermentácie sa hodnota pH udržiavala na 7,2 pridávaním amoniaku do prívodu vzduchu fermentora alebo fosfónovej kyseliny. Amoniak slúži tiež ako

zdroj dusíka pre fermentáciu. Rýchlosť miešadla sa regulovala udržiavaním obsahu rozpusteného kyslíka pri 30 % nasýtenej hodnoty. Po zastavení dávkovania zdroja uhlíka fermentácia pokračovala, pokým obsah rozpusteného kyslíka (pO_2) nedosiahol hodnotu 95 % nasýtenej hodnoty. Fermentácia sa potom zastavila a organizmus sa tepelne usmrtil. Toto sa uskutočnilo udržiavaním fermentačného roztoku pri teplote 100 °C počas jednej hodiny. Usmrtenie sa dokázalo plátovaním. Koncentrácia kyseliny D-pantoténovej, ak sa zastavila po 72 hodinách, predstavovala 28 g/l.

Je taktiež možné analogickým spôsobom produkovať fermentačné vývary, ktoré majú titre kyseliny pantoténovej vyššie ako 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l, bez zavádzania β-alanínu.

Pri tejto fermentácii sa pomocný ión kyseliny D-pantoténovej nastavil s použitím tlmivého roztoku hydrogenfosforečnanu dvojdraselného/dihydrogenfosforečnanu draselného vo fermentácii tak, že sa získala draselná soľ kyseliny D-pantoténovej, t.j. D-pantotenát draselný.

Príklad 2

Odstránenie buniek a sušenie fermentačného roztoku z *E. coli*, obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú

Fermentačný roztok obsahujúci kyselinu D-pantoténovú sa produkoval ako v príklade 1 amerického patentového dokumentu US 6,013,492 s *Escherichia coli* IFO 814/pFV 31. Potom sa do fermentačného roztoku zavádzal plyn, až pokým sa zdroj uhlíka úplne nespotreboval, pokým sa obsah rozpusteného kyslíka (pO_2) nezvýšil nad 80 %. Bunky sa následne odstránili s použitím separátora.

Obsah kyseliny D-pantoténovej v tomto prípade predstavuje 38,5 g/l. Po odparení s použitím rotačnej odparky vo vákuu (< 100 mbar) na obsah pevných látok približne 45 % hmotnostných sa koncentrát vysušil v laboratórnej rozprašovacej sušičke pri nasledujúcich podmienkach:

Teplota vstupujúceho plynu:	100 až 250 °C
Teplota vystupujúceho plynu:	60 až 150 °C

Získal sa voľne tečúci produkt so stredným priemerom častíc 20 až 300 μm.

Príklad 3

Sušenie fermentačného roztoku z *B. subtilis* obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú s ďalším odstraňovaním biomasy

Fermentačný roztok (1 l) z príkladu 1 sa vysušil v laboratórnej rozprašovacej sušičke pri nasledujúcich podmienkach:

Teplota vstupujúceho plynu:	100 až 250 °C
Teplota vystupujúceho plynu:	60 až 150 °C

Získal sa voľne tečúci produkt so stredným priemerom častíc 20 až 300 μm.

Príklad 4

Odstránenie buniek a sušenie fermentačného roztoku obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú, s laktózou ako prísadou

Biomasa z fermentačného roztoku (1 l) z príkladu 1 sa centrifúgovala v centrifúge. Supernatant sa zmiešal s 30 g laktózy a vysušil sa v laboratórnej rozprašovacej sušičke pri nasledujúcich podmienkach:

Teplota vstupujúceho plynu:	100 až 250 °C
Teplota vystupujúceho plynu:	60 až 150 °C

Získal sa voľne tečúci produkt so stredným priemerom častíc 40 až 500 μm a obsahom voľnej kyseliny D-pantoténovej > 30 % hmotnostných.

Príklad 5

Sušenie fermentačného roztoku obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú s chemicky produkovaným D-pantotenátom vápenatým ako prísadou, napríklad na nastavenie pevnej koncentrácie kyseliny D-pantoténovej vo finálnom produkte

Biomasa z fermentačného roztoku (1 l) z príkladu 1 sa centrifúgovala v centrifúge. Supernatant sa zmiešal so 100 g chemicky produkovaného

D-pantotenátu vápenatého a vysušil sa v laboratórnej rozprašovacej sušičke pri nasledujúcich podmienkach:

Teplota vstupujúceho plynu: 100 až 250 °C

Teplota vystupujúceho plynu: 60 až 150 °C

Získal sa voľne tečúci produkt so stredným priemerom častíc 40 až 500 μm a obsahom voľnej kyseliny D-pantoténovej > 60 % hmotnostných.

Príklad 6

Nastavenie obsahu vápnika vo formuláciách kyseliny D-pantoténovej z fermentačných roztokov

Fermentačný roztok obsahujúci kyselinu D-pantoténovú má po odstránení biomasy obsah pevných látok 95 g/l, z ktorých 70 g/l predstavuje kyselina D-pantoténová a 25 g/l ďalšie pevné látky (soli, zvyšky biomasy, ďalšie pevné zložky, v závislosti od fermentačného média, žiadne vápenaté ióny).

Výsledné obsahy kyseliny D-pantoténovej vo formulovanom produkte po pridaní rozličných vápenatých solí je uvedené nižšie. V týchto prípadoch sa obsah vápnika nastavil tak, že je prítomný 1 mól vápenatých iónov na 2 móly kyseliny D-pantoténovej.

Pridaná vápenatá soľ (1 mól na 2 móly kyseliny D-pantoténovej)	Obsah kyseliny D-pantoténovej vo formulovanom produkte [% hmotnostné]
žiadne pridanie	74
$Ca(OH)_2$	66
CaO	67
$CaSO_4$	57
$CaHPO_4$	60
$CaCO_3$	63
$Ca(Cl)_2$	62

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1: Blokový diagram postupu spôsobu produkcie soli kyseliny D-pantoténovej sušením a/alebo formulovaním fermentačného roztoku.

Obrázok 2: Blokový diagram postupu spôsobu produkcie soli kyseliny D-pantoténovej sušením a/alebo formulovaním fermentačného roztoku, s prídavným krokom zahustenia a recyklovania odstránenej vody do fermentácie.

Obrázok 3: Blokový diagram postupu spôsobu produkcie soli kyseliny D-pantoténovej sušením a/alebo formulovaním fermentačného roztoku s odstránením buniek.

Obrázok 4: Blokový diagram postupu spôsobu produkcie soli kyseliny D-pantoténovej, pri ktorom sa lýza buniek a/alebo usmrtenie organizmu uskutočňuje po fermentácii (A) a/alebo po odstránení buniek (B).

Obrázok 5: Blokový diagram postupu spôsobu produkcie soli kyseliny D-pantoténovej, pri ktorom sa pridajú prísady na sušenie.

Obrázok 6: Blokový diagram postupu spôsobu produkcie soli kyseliny D-pantoténovej, pri ktorom sa požadovaný katión získa výberom solí použitých vo fermentačnom médiu.

PP 326-03

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob produkcie prídavku do krmiva pre zvieratá, ktorý obsahuje voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli, vyznačujúci sa tým, že

   a) organizmus produkujúci kyselinu D-pantoténovú sa fermentuje v kultivačnom médiu obsahujúcom najmenej jeden zdroj uhlíka a jeden zdroj dusíka, bez zavádzania ďalších prekurzorov a

   b) fermentačný roztok obsahujúci kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli sa podrobí, bez uskutočnenia ďalších korkov spracovania, sušeniu a/alebo úprave.

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že fermentácia sa uskutočňuje až pokým sa nedosiahne obsah pevných látok najmenej 6 % hmotnostných, výhodne 7 až 25 % hmotnostných a/alebo obsah kyseliny D-pantoténovej najmenej 2 až 15 % hmotnostných, výhodne 4 až 15 % hmotnostných.

3. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že pridávanie zdroja uhlíka sa zastaví a/alebo reguluje takým spôsobom, že sa nastaví v skutočnosti nulová koncentrácia a/alebo vo fermentácii sa pokračuje pokým sa vo fermentačnom roztoku nedosiahne koncentrácia rozpusteného kyslíka najmenej 80 %, výhodne 90 % a predovšetkým výhodne 95 % z nasýtenej hodnoty.

4. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 3, vyznačujúci sa tým, že sa použije organizmus produkujúci kyselinu D-pantoténovú, v ktorom je deregulovaná biosyntéza kyseliny pantoténovej (pan) a/alebo izoleucínu-valínu (ilv) a/alebo aspartát αdekarboxylázy (panD).

5. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 4, vyznačujúci sa tým, že ako je potrebné, biomasa sa odstráni z fermentačného roztoku pred sušením a/alebo formulovaním.

6. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 5, vyznačujúci sa tým, že fermentačný roztok sa zahustí odstránením vody, prípadne so súčasným recyklovaním vody

do fermentačného procesu pred sušením a/alebo formulovaním a prípadne po odstránení biomasy.

7. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 6, vyznačujúci sa tým, že pred sušením a/alebo formulovaním sa uskutoční najmenej jeden z nasledujúcich krokov zahrňujúcich

   1) lýzu a/alebo usmrtenie biomasy a/alebo

   2) odstránenie biomasy z fermentačného roztoku a/alebo

   3) pridanie ďalších prísad a/alebo

   4) zahustenie fermentačného roztoku, výhodne odstránením vody a, prípadne, súčasným recyklovaním vody do fermentačného procesu a/alebo

   5) kombináciami krokov 1) až 4).

8. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 7, vyznačujúci sa tým, že lýza a/alebo usmrtenie biomasy sa uskutočňuje ešte vo fermentačnom roztoku alebo až po odstránení biomasy z fermentačného roztoku.

9. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 8, vyznačujúci sa tým, že ďalšie prísady a/alebo zmesi prísad sa pridajú k fermentačnému roztoku pred a/alebo počas zahusťovania, sušenia a/alebo formulovania.

10. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 9, vyznačujúci sa tým, že, vztiahnuté na obsah kyseliny D-pantoténovej vo formulovanom produkte, sa na 2 móly kyseliny D-pantoténovej pridá 1 mól vápenatých iónov vo forme vápenatej soli ako prísady pred a/alebo počas zahusťovania, sušenia a/alebo formulovania.

11. Prídavok do krmiva pre zvieratá na báze fermentačného roztoku pripravený fermentáciou najmenej jedného organizmu produkujúceho kyselinu D-pantoténovú, vyznačujúci sa tým, že obsahuje prinajmenšom voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli v koncentrácii najmenej 30 až 95 % hmotnostných, celkový obsah sacharidov predstavuje 0,1 až 15 % hmotnostných a obsah proteínu je menej ako 5 až 50 % hmotnostných, vztiahnuté na sušinu.

12. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa nároku 11, vyznačujúci sa tým, že obsahuje 50 až 95 % hmotnostných, výhodne 70 až 95 % hmotnostných, predovšetkým výhodne 60 až 80 % hmotnostných a špecificky výhodne viac ako 80 % hmotnostných voľnej kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí.

13. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 12, vyznačujúci sa tým, že nespracovaný fermentačný roztok obsahuje najmenej 10 g/l, výhodne najmenej 20 g/l a predovšetkým výhodne najmenej 40 g/l kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí.

14. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 13, vyznačujúci sa tým, že obsahuje vápenatú, draselnú, horečnatú, sodnú a/alebo amónnu soľ kyseliny D-pantoténovej a/alebo ich zmesi.

15. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 14, vyznačujúci sa tým, že zloženie sušiny má prinajmenšom nasledujúce komponenty:

a) voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli	najmenej 30 až 95 % hmotnostných
b) proteíny	maximálne 50 % hmotnostných
c) celkové sacharidy	maximálne 15 % hmotnostných
d) minerálne látky	maximálne 20 % hmotnostných

16. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 15, vyznačujúci sa tým, že obsah proteínu predstavuje menej ako 10 % hmotnostných, výhodne menej ako 7 % hmotnostných a predovšetkým výhodne menej ako 5 % hmotnostných.

17. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 16, vyznačujúci sa tým, že obsah celkových sacharidov predstavuje menej ako 10 % hmotnostných, výhodne približne 0,5 % hmotnostných a predovšetkým približne 0,1 % hmotnostných.

18. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 17, vyznačujúci sa tým, že zvyškový obsah vody predstavuje menej ako 5 % hmotnostných, výhodne 1 až 3 % hmotnostné a predovšetkým výhodne 0,5 až 2 % hmotnostné.

19. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 18, vyznačujúci sa tým, že obsahuje neaktívne, živé a/alebo životaschopné organizmy produkujúce kyselinu D-pantoténovú.

20. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 19, vyznačujúci sa tým, že obsahuje neaktívne, živé a/alebo životaschopné mikroorganizmy, výhodne huby, kvasinky a/alebo baktérie.

21. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 20, vyznačujúci sa tým, že obsahuje neaktívne, živé a/alebo životaschopné huby z rodu *Mucor*, kvasinky z rodu *Saccharomyces* a/alebo baktérie z čeľadí *Enterobacteriaceae, Salmonellae, Pseudomonas, Bacillaceae, Coryneform* a/alebo z rodu *Proteus* a/alebo *Actinum* a/alebo ich zmesi.

22. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 21, vyznačujúci sa tým, že obsahuje ďalšie prísady, výhodne na báze sacharidov a/alebo obilnín a/alebo strukovín a/alebo minerálnych solí a/alebo kyselinu D-pantoténovú, jej soli a/alebo ich zmesi.

23. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 22, vyznačujúci sa tým, že je vo forme prípravku so zdanlivou hustotou 0,35 až 0,7 kg/l, výhodne 0,4 až 0,6 kg/l.

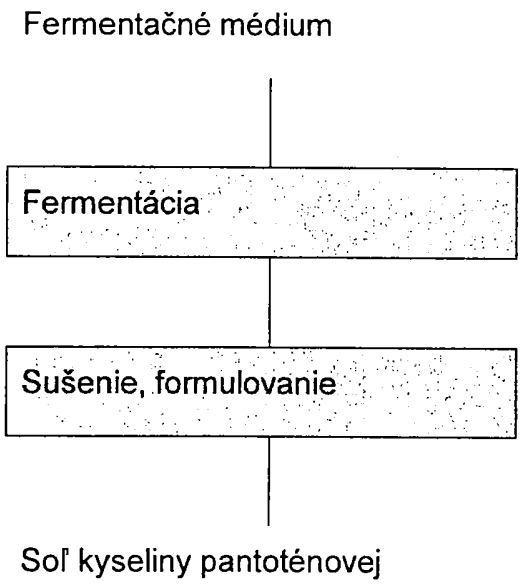
24. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 23, vyznačujúci sa tým, že má stredný priemer častíc v rozsahu 10 až 2000 µm, výhodne 20 až 1500 µm, predovšetkým výhodne 25 až 1000 µm a najvýhodnejšie 30 až 800 µm.

25. Prídavok do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 alebo 24, vyznačujúci sa tým, že je vo forme prášku, granúl, peliet, ktoré sú potiahnuté, a/alebo ich vo forme ich kombinácií.

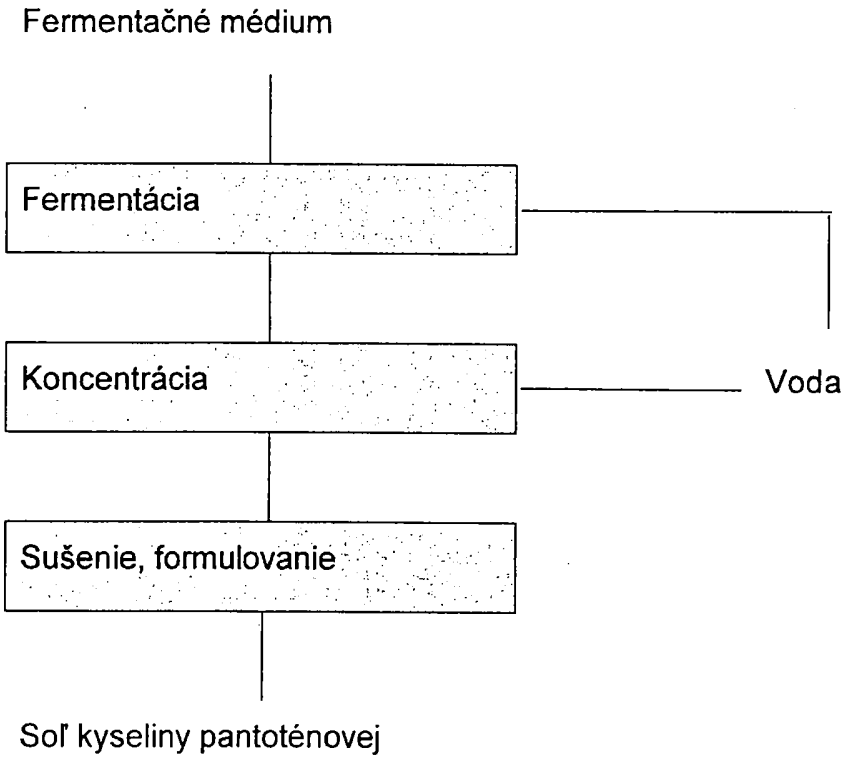
26. Použitie prídavku do krmiva pre zvieratá podľa niektorého z nárokov 11 až 25, ako prísady do krmiva pre zvieratá a/alebo ako kŕmnych doplnkov pre zvieratá.

PP 326-03

Obr. 1

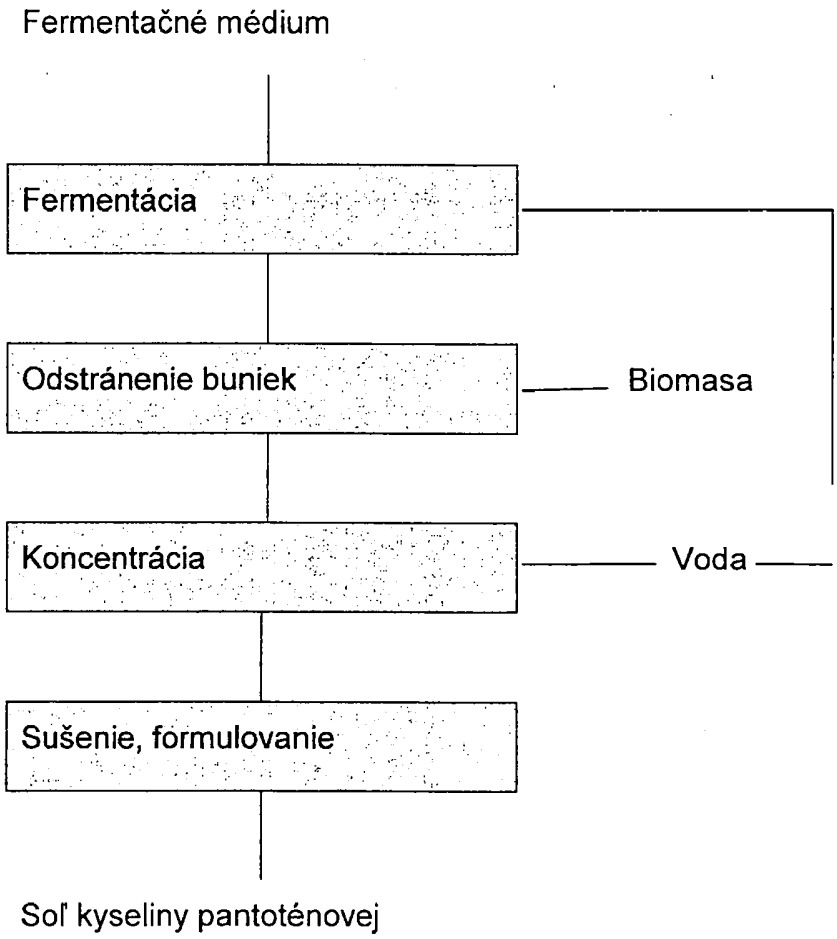


Obr. 2



PP 326-03

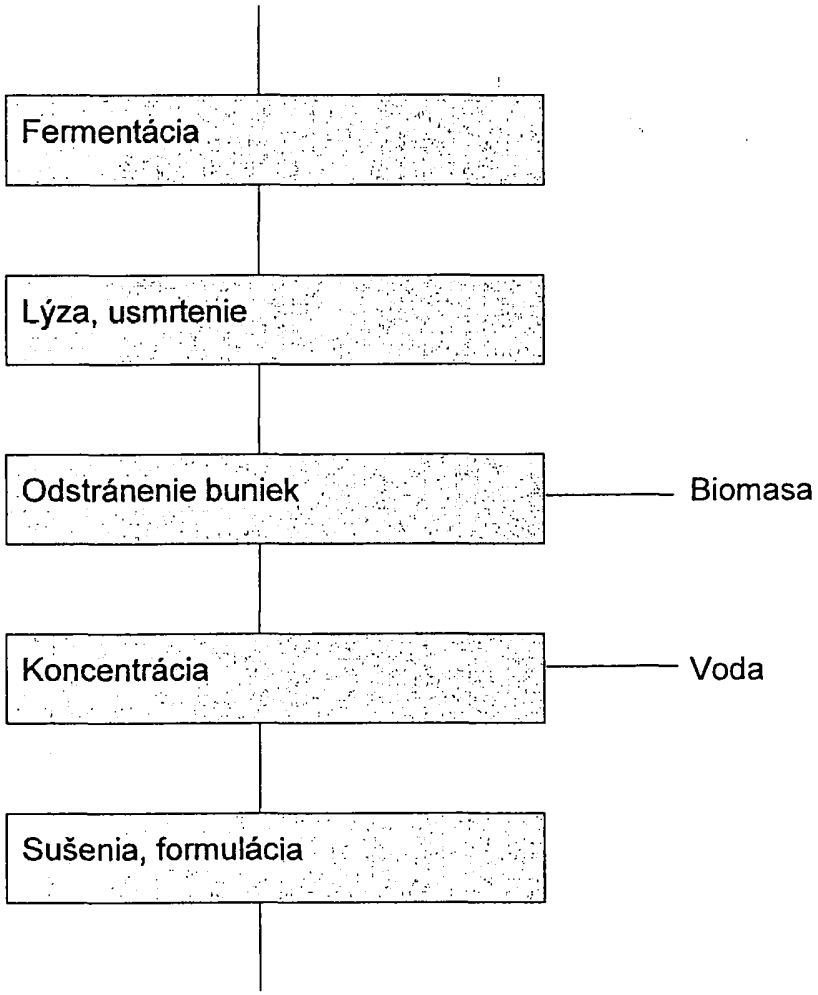
Obr. 3



PP 326-03

Obr. 4

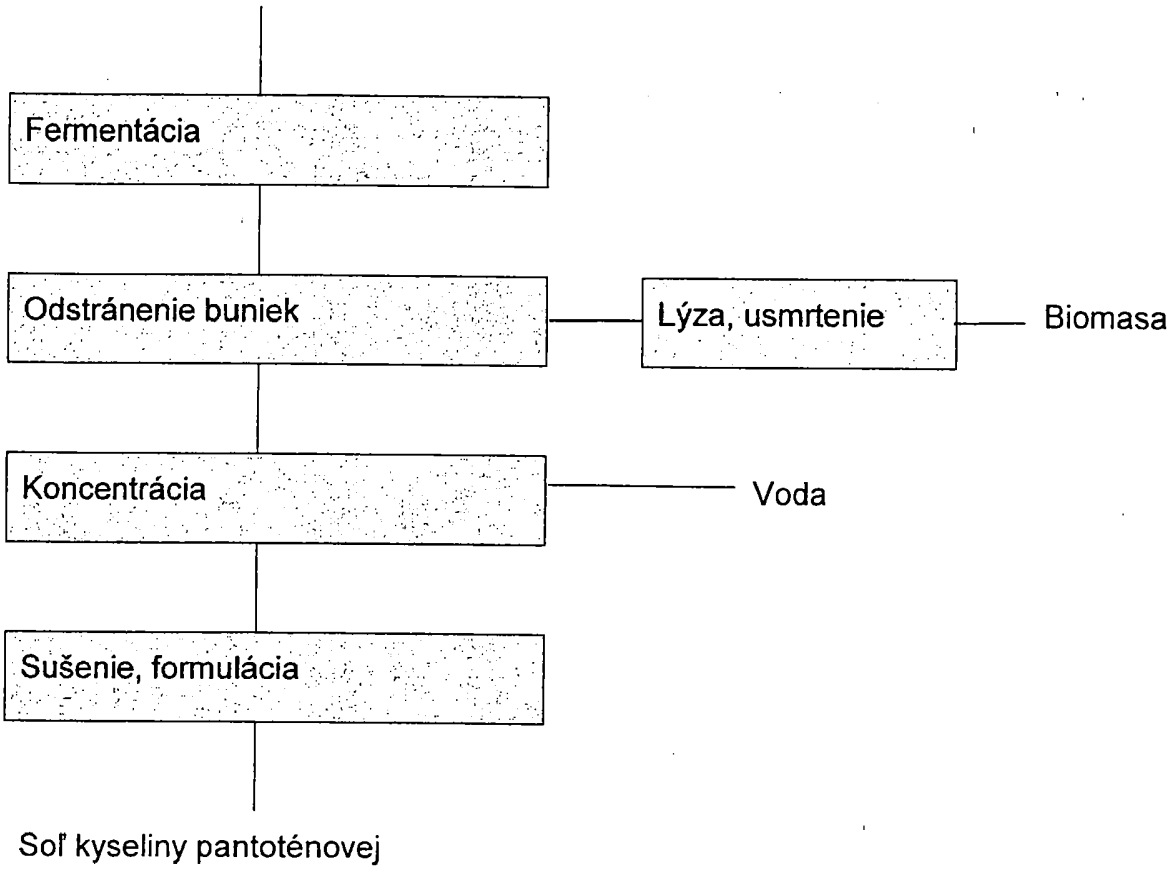
A) Fermentačné médium



PP 326-03

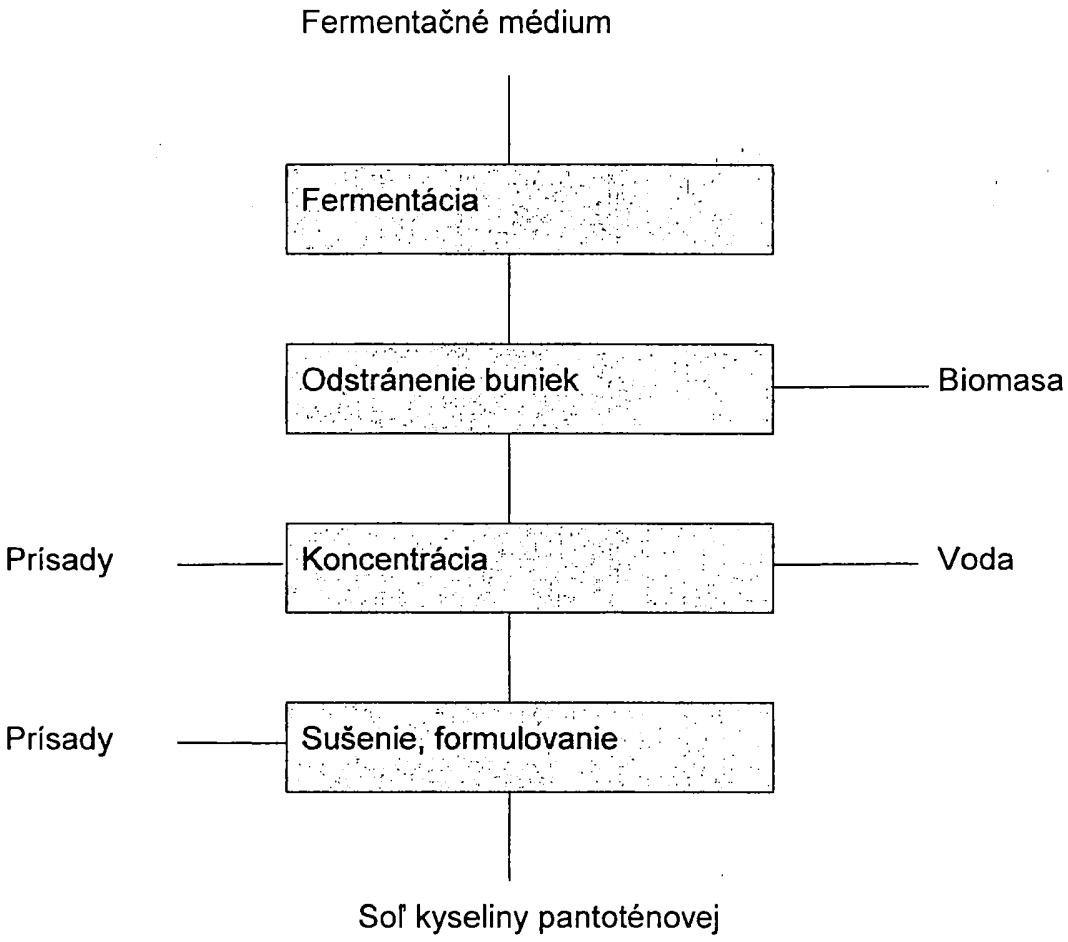
Obr. 4

B) Fermentačné médium



PP 326-03

Obr. 5



PP 326-03

Obr. 6

