

19



LE GOUVERNEMENT  
DU GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG  
Ministère de l'Économie

11

N° de publication :

**LU507172**

12

## BREVET D'INVENTION

**B1**

21 N° de dépôt: LU507172

51 Int. Cl.:

C12P 1/00, A61K 31/00, A23L 5/00

22 Date de dépôt: 08/05/2024

30 Priorité:

43 Date de mise à disposition du public: 08/11/2024

47 Date de délivrance: 08/11/2024

73 Titulaire(s):

FNI GROUP SDN.BHD. – Shuangxi Danian Town,  
Guaramda County, Kedah Prefecture (Malaisie)

72 Inventeur(s):

NURFARIH Hanna – Malaisie, DONG Dawei – Malaisie,  
LIU Guozhi – Malaisie

74 Mandataire(s):

IP SHIELD – 1616 Luxembourg (Luxembourg)

54 **EIN VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND ANWENDUNG VON VITAMIN D2 AUS ESSBAREN PILZEN ZUR FÖRDERUNG  
DER KALZIUMAUFNAHME, ZUR PRÄVENTION VON RACHITIS UND ZUR STÄRKUNG DES IMMUNSYSTEMS.**

57 Diese Erfindung betrifft das Gebiet der Vitaminherstellungstechnologie und speziell ein Verfahren zur Herstellung und Anwendung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt. Es umfasst folgende Schritte: Vorbereitung des Rohmaterials, Auswahl von essbaren Pilzen mit einem hohen Gehalt an Ergosterol als Rohstoff; Kultivierung und Optimierung, gentechnische Modifikation der fermentierten und kultivierten essbaren Pilze; Lichtumwandlung, Bestrahlung der Kulturen mit Ultravioletlicht. Der vorteilhafte Effekt besteht darin: Durch die Konstruktion eines Genexpressionsvektors, die Transformation von Pilzzellen sowie die Auswahl und Identifikation von Transformanten mit hoher Synthesekapazität wird die Genexpression, die mit der Synthese von Ergosterol und der Umwandlung zu Vitamin D2 verbunden ist, erhöht. Dies führt zur Züchtung von essbaren Pilzsorten mit höheren Ergosterolgehalten, um die Produktion und Effizienz von Vitamin D2 zu steigern.

# **Ein Verfahren zur Herstellung und Anwendung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen zur Förderung der Kalziumaufnahme, zur Prävention von Rachitis und zur Stärkung des Immunsystems**

## **Technischer Bereich**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Vitaminherstellung, insbesondere ein Verfahren zur Herstellung und Anwendung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen zur Förderung der Kalziumaufnahme, zur Prävention von Rachitis und zur Stärkung des Immunsystems.

## **Technologie im Hintergrund**

10 Vitamin D2 erscheint als weiße bis fast weiße flockige oder nadelförmige Kristalle und ist instabil bei Lichtexposition oder in Luft. Vitamin D2 wird hauptsächlich zur Prävention und Behandlung von Vitamin-D-Mangel eingesetzt; gleichzeitig kann Vitamin D2 auch zur Behandlung von chronischer Hypokalzämie, Hypophosphatämie, Rachitis sowie Osteomalazie in Verbindung mit chronischer Niereninsuffizienz, familiärer Hypophosphatämie, Hypoparathyreoidismus (postoperativ, idiopathisch oder Pseudohypoparathyreoidismus) 15 verwendet werden; außerdem ist Vitamin D2 wirksam bei akuter, chronischer und potenzieller postoperativer Tetanie sowie idiopathischer Tetanie.

20 In der bestehenden Technik sind die Herstellungsverfahren für Vitamin D2 effizienter und umweltfreundlicher. Forscher werden weiterhin neue Extraktions- und Raffinationsmethoden erforschen, um die Reinheit und Aktivität von Vitamin D2 zu verbessern und gleichzeitig den Energieverbrauch und die Emissionen während des Produktionsprozesses zu reduzieren. Beispielsweise ermöglichen fortschrittliche Technologien wie die Mikrowellen-unterst ü tzte 25 Extraktion und die überkritische Fluidextraktion eine effizientere Extraktion von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen. Es wurde jedoch die Optimierung der Vitamin-D2-Quelle – der essbaren Pilze – vernachlässigt, d.h., es fehlt die Optimierung der essbaren Pilze selbst, um die Ausbeute an extrahiertem Vitamin D2 zu erhöhen.

30 Daher ist ein Verfahren zur Herstellung und Anwendung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen notwendig, das das Problem der unzureichenden Rohstoffoptimierung in der bestehenden Vitamin-D2-Extraktion löst; dies könnte die genetischen Eigenschaften der Rohstoffe optimieren, um die Ausbeute an extrahiertem Vitamin D2 zu erhöhen.

## **Inhalt der Erfindung**

35 Das Ziel dieser Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung und Anwendung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen zur Förderung der Kalziumaufnahme, zur Prävention von Rachitis und zur Stärkung des Immunsystems bereitzustellen, um die in der bestehenden Technik angesprochenen Probleme der mangelnden Optimierung der Rohstoffe für die Vitamin D2-Extraktion zu lösen; es kann die genetischen Eigenschaften der Rohstoffe optimieren, um die 40 Ausbeute an extrahiertem Vitamin D2 zu erhöhen.

45 Um dieses Ziel zu erreichen, bietet die vorliegende Erfindung folgende technische Lösung: Ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, umfassend die folgenden Schritte:

40 Rohstoffvorbereitung, Auswahl von essbaren Pilzen, die reich an Ergosterol sind;

45 Kultivierung und Optimierung, genetische Modifikation von fermentierten und kultivierten essbaren Pilzen;

Lichtumwandlung, Bestrahlung des Kulturmediums mit ultraviolettem Licht;

Extraktion und Reinigung, Verwendung von Nanotechnologie zur Reinigung von Vitamin D2.

Bevorzugt umfassen die spezifischen Schritte der Rohstoffvorbereitung:

Auswahl von essbaren Pilzen, die reich an Ergosterol sind, als Rohstoff zur Herstellung von Vitamin D2.

Bevorzugt umfassen die spezifischen Schritte der Kultivierung und Optimierung:

Inokulation der Pilze in ein Kulturmedium, das Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen sowie

5 Mineralien und Spurenelemente enthält, Kontrolle des pH-Werts des Kulturmediums auf neutral oder leicht sauer, Platzierung des Kulturgefäßes in einem konstanten Temperaturschüttler oder einem Fermenter, Festlegung der geeigneten Temperatur auf 25-30 ° C;

10 Konstruktion von Genexpressionsträgern, Transformation von Pilzzellen sowie Auswahl und Identifikation von Transformanten mit effizienter Synthesefähigkeit, Erhöhung der Genexpression, die mit der Synthese von Ergosterol und der Umwandlung in Vitamin D2 verbunden ist.

Bevorzugt umfassen die spezifischen Schritte der Lichtumwandlung:

15 Durch Zerkleinern werden die Zellwände der Pilze zerstört, wodurch Vitamin D2 in das Kulturmedium freigesetzt wird; für die Extraktion wird Ethanol verwendet.

20 Die Verwendung von Nanofiltrationsmembranen oder Nano-Adsorbentien ermöglicht die Filtration und Adsorption des Extrakts, um Verunreinigungen zu entfernen und die Reinheit von Vitamin D2 zu erhöhen.

25 Die nach der Extraktion und Reinigung erhaltene Vitamin D2-Lösung wird einem Kristallisierungsprozess unterzogen, durch Zentrifugation werden die Kristalle von der Mutterlauge getrennt und durch Trocknungsverfahren wird die Feuchtigkeit entfernt.

20 Bevorzugt umfasst der Prozess auch:

30 Das getrocknete Vitamin D2 wird gemahlen und in gut versiegelte Verpackungsbehälter abgefüllt, um die Hygiene und Sicherheit des Produkts zu gewährleisten.

35 Die Anwendung von nach diesem Verfahren hergestelltem Vitamin D2 aus essbaren Pilzen zur Förderung der Kalziumaufnahme.

40 Die Anwendung von nach diesem Verfahren hergestelltem Vitamin D2 aus essbaren Pilzen zur Prävention von Rachitis.

45 Die Anwendung von nach diesem Verfahren hergestelltem Vitamin D2 aus essbaren Pilzen zur Stärkung des Immunsystems.

50 Die Anwendung von nach diesem Verfahren hergestelltem Vitamin D2 aus essbaren Pilzen zur gleichzeitigen Förderung der Kalziumaufnahme, Prävention von Rachitis und Stärkung des Immunsystems.

55 Im Vergleich zur bestehenden Technik bietet die Erfindung folgende Vorteile:

60 Das von der Erfindung vorgeschlagene Verfahren zur Herstellung und Anwendung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen zur Förderung der Kalziumaufnahme, zur Prävention von Rachitis und zur Stärkung des Immunsystems ermöglicht durch den Bau von Genexpressionsträgern, die Transformation von Pilzzellen sowie die Auswahl und Identifikation von Transformanten mit hoher Synthesefähigkeit eine Erhöhung der Genexpression, die mit der Synthese von Ergosterol und der Umwandlung in Vitamin D2 verbunden ist. Es werden Pilzsorten mit höheren Ergosterolgehalten gezüchtet, um die Ausbeute und Effizienz von Vitamin D2 zu verbessern; dies löst weiterhin das Problem der unzureichenden Optimierung der Rohstoffe in der bestehenden Vitamin D2-Extraktion; es können genetische Eigenschaften der Rohstoffe optimiert werden, um die Ausbeute an extrahiertem Vitamin D2 zu erhöhen.

### **Detaillierte Beschreibung**

Um die Ziele, die technischen Lösungen und die Vorteile dieser Erfindung klar und vollständig zu beschreiben, ist zu verstehen, dass die hier beschriebenen spezifischen Ausfü

hrungsbeispiele nur einen Teil der Ausführungsbeispiele der Erfindung darstellen und nicht alle.<sup>U507172</sup> Sie dienen nur zur Erklärung der Ausführungsbeispiele der Erfindung und nicht zur Begrenzung der Ausführungsbeispiele der Erfindung. Alle anderen Ausführungsbeispiele, die von Personen mit gewöhnlichen Fachkenntnissen auf diesem Gebiet ohne kreative Arbeit erzielt werden, fallen unter den Schutzbereich dieser Erfindung.

### Ausführungsbeispiel Eins

Diese Erfindung bietet eine technische Lösung: Ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt. Das Verfahren umfasst folgende Schritte:

1. Rohstoffvorbereitung: Auswahl von essbaren Pilzen, die reich an Ergosterol sind, als Rohstoff. Zunächst müssen essbare Pilze, die reich an Ergosterol sind, als Rohstoff zur Herstellung von Vitamin D2 ausgewählt werden. Ergosterol ist eine Vorläufersubstanz von Vitamin D2, die durch einen spezifischen Umwandlungsprozess in Vitamin D2 umgewandelt werden kann. Unter den verschiedenen essbaren Pilzen werden Champignons aufgrund ihres hohen Gehalts, der einfachen Verfügbarkeit und Verarbeitung häufig als hochwertiger Rohstoff für die Herstellung von Vitamin D2 ausgewählt. Die ausgewählten Champignons müssen gründlich gereinigt werden, um Oberflächenschmutz und Verunreinigungen zu entfernen. Dieser Schritt ist entscheidend für die Hygiene und Qualität des nachfolgenden Herstellungsprozesses. Bei der Reinigung wird fließendes Wasser oder ein spezielles Lebensmittelreinigungsmittel verwendet, um die Oberfläche der Champignons zu säubern. Nach der Reinigung müssen die Champignons getrocknet werden, um überschüssiges Wasser zu entfernen. Das Trocknen erfolgt entweder durch natürliches Lufttrocknen oder mithilfe eines Lebensmitteltrockners. Getrocknete Champignons sind leichter zu lagern und zu transportieren und erleichtern auch die nachfolgenden Zerkleinerungs- und Extraktionsprozesse. Die getrockneten Champignons müssen zu einem feinen Pulver zermahlen werden, um eine effiziente Extraktion zu ermöglichen. Das Zermahlen erfolgt mechanisch oder manuell, um sicherzustellen, dass die Champignons ausreichend fein zerkleinert werden, um die Extraktionseffizienz zu erhöhen. Das zerkleinerte Champignonpulver muss sorgfältig gelagert werden, um Feuchtigkeit, Kontamination und Verderb zu vermeiden. Die Lagerbedingungen sollten trocken, kühl und gut belüftet sein und direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Gleichzeitig ist es wichtig, das gelagerte Champignonpulver regelmäßig zu überprüfen und umzurühen, um seinen guten Zustand sicherzustellen.

2. Zweitens, Kultivierung und Optimierung: genetische Modifikation von fermentierten und kultivierten essbaren Pilzen; zur Unterstützung des Wachstums und des Stoffwechsels der Pilze wird ein Nährmedium vorbereitet, das reich an Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, Mineralien und Spurenelementen ist. Kohlenstoffquellen wie Glukose oder Saccharose liefern Energie für die Pilze; Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Pepton unterstützen das Zellwachstum; Mineralien und Spurenelemente gewährleisten die normalen Lebensaktivitäten der Pilze. Gleichzeitig wird der pH-Wert des Mediums auf neutral oder leicht sauer eingestellt, um die natürliche Wachstumsumgebung der Pilze nachzuahmen. Die ausgewählten Pilze werden in das vorbereitete Medium geimpft, wobei der Impfprozess steril durchgeführt werden muss, um Kontaminationen durch Fremdorganismen zu vermeiden. Nach der Impfung wird der Kulturbehälter in einem konstanten Temperaturschüttler oder Fermenter platziert, wobei die geeignete Temperatur

normalerweise zwischen 25-30 ° C eingestellt wird, um ein gutes Wachstum und eine gute Vermehrung der Pilze zu gewährleisten. Darüber hinaus muss, abhängig von den Wachstumseigenschaften der Pilze, die Schüttelgeschwindigkeit oder die Belüftung des Fermenters angepasst werden, um den Sauerstoffbedarf der Pilze zu decken. Um die Fähigkeit der Pilze zur Synthese von Vitamin D2 weiter zu verbessern, werden genetische Engineering-Techniken angewandt. Zunächst wird ein Genexpressionsträger konstruiert, und die Gene, die für Schlüsselenzyme der Synthese von Ergosterol und der Umwandlung in Vitamin D2 kodieren, werden in den Träger geklont. Dann werden diese Träger durch Transformationstechniken in die Pilzzellen eingebracht, so dass die Pilze in der Lage sind, diese Gene zu exprimieren. Die transformierten Pilzzellen müssen durch Screening und Identifikation ausgewählt werden, indem die Synthesefähigkeiten verschiedener Transformanten verglichen werden, um Stämme mit hoher Syntheseleistung auszuwählen. Um die Produktion von Vitamin D2 weiter zu erhöhen, müssen auch die Kulturbedingungen optimiert werden. Dies beinhaltet die Anpassung der Zusammensetzung des Mediums, des pH-Wertes, der Temperatur, der Feuchtigkeit sowie der Lichtverhältnisse, um das optimale Wachstum und den Metabolismus der Pilze zu ermöglichen. Die kultivierten und optimierten Pilzstämme müssen sorgfältig aufbewahrt werden, um die Stabilität ihrer genetischen Eigenschaften und ihre Nachhaltigkeit zu gewährleisten. Methoden wie Gefrierkonservierung, Trockenkonservierung oder Lagerung in flüssigem Stickstoff können verwendet werden, um die Stämme langfristig zu lagern. Gleichzeitig können die Stämme bei Bedarf passagiert und reanimiert werden, um sicherzustellen, dass sie kontinuierlich für die Produktion von Vitamin D2 verwendet werden können.

3. Drittens, Lichtumwandlung: Bestrahlung des Kulturmediums mit ultraviolettem Licht; Vorbereitung einer professionellen UV-Lichtquelle und entsprechender Beleuchtungsausrüstung. Die Auswahl der UV-Lichtquelle ist entscheidend, da sichergestellt werden muss, dass die emittierte UV-Wellenlänge für die Umwandlung von Ergosterol in Vitamin D2 in den Pilzzellen geeignet ist. Gleichzeitig sollte die Beleuchtungsausrüstung eine stabile Leistung und eine einstellbare Lichtintensität bieten, um den Bedürfnissen verschiedener Pilzstämme oder verschiedener Wachstumsphasen gerecht zu werden. Vor der Lichtumwandlung werden die Pilze bis zu einer geeigneten Wachstumsphase kultiviert. Dies erfolgt normalerweise während der exponentiellen Wachstumsphase oder der stabilen Wachstumsphase der Pilze, um sicherzustellen, dass die Zellen ausreichend Ergosterol als Vorläufersubstanz enthalten. Gleichzeitig müssen die Konzentration und Homogenität des Pilzkulturmediums kontrolliert werden, um die Konsistenz der Reaktion während der Lichtumwandlung zu gewährleisten. Die Schlüsselparameter für die Lichtumwandlung umfassen Lichtintensität und Bestrahlungszeit. In diesem Beispiel wurde die Lichtintensität auf 10 Watt pro Quadratmeter eingestellt, ein optimierter Parameter, der eine effiziente Umwandlung gewährleistet, ohne die Pilzzellen übermäßig zu schädigen. Die Bestrahlungszeit wird je nach den Eigenschaften des Pilzstamms und den experimentellen Anforderungen angepasst und liegt normalerweise zwischen sechs und vierzehn Stunden. Eine zu lange Bestrahlungszeit kann Zellschäden oder den Abbau des Produkts verursachen, während eine zu kurze Bestrahlungszeit möglicherweise nicht ausreicht, um eine vollständige Umwandlung zu erreichen. Das vorbereitete Pilzkulturmedium wird in die Beleuchtungseinrichtung gebracht, um sicherzustellen, dass das Kulturmedium gleichmäßig dem UV-Licht ausgesetzt ist. Zudem ist es wichtig, die Temperatur und Luftfeuchtigkeit der Beleuchtungsumgebung zu kontrollieren, um das natürliche Wachstumsumfeld der Pilze zu simulieren. Nach Beendigung der Beleuchtung müssen die Pilzkulturen weiterverarbeitet werden. Dies umfasst das Beenden der Beleuchtung, das

Sammeln des Kulturmediums, die Extraktion und Reinigung von Vitamin D2. Während des Extraktions- und Reinigungsprozesses ist darauf zu achten, dass das Licht das Produkt nicht beschädigt, um die Qualität und Reinheit des Endprodukts zu gewährleisten. LU507172

4. Viertens, Extraktion und Reinigung, Verwendung von Nanotechnologie zur Reinigung von Vitamin D2; Um Vitamin D2 aus den Pilzzellen freizusetzen, muss zunächst die Zellwand der Pilze zerstört werden. Dies wird normalerweise durch physikalische oder chemische Methoden erreicht, wie Hochdruck-Homogenisierung, Ultraschallzerkleinerung oder Enzymhydrolyse. Es ist entscheidend, eine für die Eigenschaften der Pilze geeignete Zerkleinerungsmethode auszuwählen, um die Zerstörung der Vitamin D2-Moleküle zu vermeiden. Die zerkleinerten Pilzzellen setzen Vitamin D2 und andere Zellinhaltsstoffe in das Kulturmedium frei, was die nachfolgende Extraktion erleichtert. Anschließend wird ein geeignetes Lösungsmittel gewählt, um Vitamin D2 aus dem Kulturmedium zu extrahieren. Ethanol wird aufgrund seiner guten Löslichkeit für Vitamin D2 und der relativ niedrigen Kosten häufig verwendet. Während des Extraktionsprozesses wird die passende Temperatur und Dauer kontrolliert, um sicherzustellen, dass Vitamin D2 vollständig in Ethanol gelöst wird, während gleichzeitig andere unnötige Verunreinigungen vermieden werden. Der Extrakt enthält Vitamin D2, kann aber auch einige Verunreinigungen enthalten. Um diese zu entfernen und die Reinheit von Vitamin D2 zu erhöhen, werden Nanofiltrationsmembranen oder Nano-Adsorptionsmittel für Filtration und Adsorption verwendet. Nanofiltrationsmembranen haben eine sehr hohe Filtrationsgenauigkeit und können effektiv Partikel entfernen, die größer als ihre Porengröße sind; Nano-Adsorptionsmittel können selektiv bestimmte Verunreinigungen adsorbieren und entfernen. Diese Schritte können die Reinheit von Vitamin D2 erheblich erhöhen und hochwertige Rohstoffe für den nachfolgenden Kristallisierungsprozess bereitstellen. Die extrahierte und gereinigte Vitamin D2-Lösung muss kristallisiert werden. Durch Kontrolle der passenden Temperatur, Konzentration und Kristallisierungsbedingungen wird Vitamin D2 in kristallisierter Form ausgefällt. Nach der Kristallisation wird der Kristall durch Zentrifugation von der Mutterlauge getrennt. Während des Zentrifugierens bewirkt die hohe Rotationsgeschwindigkeit, dass die Kristalle am Boden des Zentrifugenröhrchens abgelagert werden, wodurch sie von der Mutterlauge getrennt werden. Schließlich wird das abgetrennte Vitamin D2-Kristall getrocknet. Dies wird üblicherweise durch Vakuumtrocknung oder Sprühtrocknung durchgeführt, um Feuchtigkeit aus den Kristallen zu entfernen und ein trockenes Vitamin D2-Produkt zu erhalten.

#### Ausführungsbeispiel Zwei

Basierend auf Ausführungsbeispiel Eins wird folgende Methode vorgeschlagen:

35 Herstellung von Vitamin D2  
 Erster Schritt: Rohstoffvorbereitung  
 Es werden frische Champignons als Rohstoff für die Herstellung von Vitamin D2 verwendet. Die Champignons sollten gereinigt, getrocknet und zerkleinert werden, um ein gleichmäßiges Pilzpulver zu erhalten.  
 40 Zweiter Schritt: Pilzzucht  
 Herstellung des Nährmediums: Glukose, Hefepulver, anorganische Salze und Spurenelemente werden in einem bestimmten Verhältnis gemischt, um ein flüssiges Nährmedium herzustellen. Der pH-Wert des Nährmediums wird auf 6,5 eingestellt.  
 Impfung und Kultivierung: Streptomyces wird in das Nährmedium geimpft und auf einem konstanten Temperaturschüttler platziert, wobei die Temperatur auf 28 ° C und die Drehzahl auf

150 U/min eingestellt wird. Die Kultivierungszeit beträgt 48 Stunden, um sicherzustellen, dass die Pilze ausreichend wachsen und metabolisieren. LU507172

**Dritter Schritt: Gentechnische Modifikation**

5 Vektorkonstruktion: Gene, die für Schlüsselenzyme der Synthese von Ergosterol und der Umwandlung in Vitamin D2 kodieren, werden in einen Expressionsvektor geklont.

Transformation und Screening: Der konstruierte Expressionsvektor wird in *Streptomyces* transformiert, und positive Transformanten werden durch Resistenzscreening ermittelt.

Expressionsvalidierung: Die positiven Transformanten werden kultiviert und ihre Produktion von Ergosterol und Vitamin D2 gemessen, um Stämme mit hoher Synthesekapazität auszuwählen.

10 **Vierter Schritt: Lichtumwandlung**

Die kultivierten Pilzzellsuspensionen werden gleichmäßig auf Kulturschalen verteilt und dann unter einer UV-Lampe der Lichtumwandlung ausgesetzt. Die Lichtintensität wird auf 5W/m<sup>2</sup> eingestellt, die Bestrahlungsdauer auf 8 Stunden. Durch die Lichtstimulation wird das Ergosterol in den Pilzzellen in Vitamin D2 umgewandelt.

15 **Fünfter Schritt: Extraktion und Reinigung**

Extraktion: Die lichtumgewandelten Pilzzellen werden zerkleinert und mit Ethanol als Lösungsmittel extrahiert. Die Extraktionstemperatur wird auf 40 ° C eingestellt, die Extraktionsdauer auf 2 Stunden, und das Verhältnis von Lösungsmittel zu Biomasse auf 3:1.

20 Filtration und Konzentration: Das Extrakt wird filtriert, um Unreinheiten zu entfernen, und dann mithilfe eines Rotationsverdampfers konzentriert, um ein rohes Vitamin D2-Extrakt zu erhalten.

Nanotechnologie-Reinigung: Verwendung einer Nanofiltrationsmembran zur Filtration des Rohextrakts, um weitere Verunreinigungen zu entfernen und die Reinheit von Vitamin D2 zu erhöhen.

25 **Sechster Schritt: Kristallisation und Trocknung**

Die gereinigte Vitamin-D2-Lösung wird kristallisiert. Durch Kontrolle der Kristallisationsbedingungen wird Vitamin D2 in kristallisierter Form ausgefällt. Anschließend werden die Kristalle in einem Vakuumtrockner getrocknet, um Feuchtigkeit zu entfernen und das Vitamin-D2-Produkt zu erhalten.

30 **Siebter Schritt: Verpackung und Lagerung**

Das getrocknete Vitamin-D2-Produkt wird verpackt, wobei gut versiegelbare Verpackungsmaterialien verwendet werden, um die Hygiene und Sicherheit des Produkts zu gewährleisten. Das verpackte Vitamin D2 wird in einer kühlen, trockenen und lichtgeschützten Umgebung gelagert, um Feuchtigkeit und Lichteinfluss zu vermeiden.

35 **Achter Schritt: Qualitätskontrolle**

Die hergestellten Vitamin-D2-Produkte werden auf Qualität geprüft, einschließlich Reinheit, Gehalt und Aktivität. Durch Vergleich mit Standardprodukten wird sichergestellt, dass die Produktqualität den relevanten Standards und Anforderungen entspricht.

**Ausführungsbeispiel Drei**

40 Anwendung von Vitamin D2, das nach einem Verfahren zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis verhindert und das Immunsystem stärkt, hergestellt wurde. Das hergestellte Vitamin D2 wird zur Förderung der Kalziumaufnahme verwendet.

**Ausführungsbeispiel Vier**

45 Anwendung von Vitamin D2, das nach einem Verfahren zur Herstellung von Vitamin D2 aus

essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis verhindert und das Immunsystem stärkt, hergestellt wurde. Das hergestellte Vitamin D2 wird zur Prävention von Rachitis verwendet. LU507172

#### Ausführungsbeispiel Fünf

Anwendung von Vitamin D2, das nach einem Verfahren zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis verhindert und das Immunsystem stärkt, hergestellt wurde. Das hergestellte Vitamin D2 wird zur Stärkung des Immunsystems verwendet.

#### Ausführungsbeispiel Sechs

Anwendung von Vitamin D2, das nach einem Verfahren zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis verhindert und das Immunsystem stärkt, hergestellt wurde. Das hergestellte Vitamin D2 wird gleichzeitig zur Förderung der Kalziumaufnahme, zur Prävention von Rachitis und zur Stärkung des Immunsystems verwendet.

#### Vergleichsbeispiel Eins

Enzymatisches Verfahren zur Herstellung von Vitamin D2, umfassend die folgenden Schritte:

##### Erster Schritt: Rohstoffvorbereitung

Verwendung von Hefe, die reich an Ergosterol ist, als Rohstoff. Die Hefe wird kultiviert, gesammelt und getrocknet, um sie für die nachfolgende Verwendung vorzubereiten.

##### Zweiter Schritt: Auswahl und Vorbereitung des Enzyms

Auswahl eines Enzyms mit hoher Effizienz für die Umwandlung von Ergosterol in Vitamin D2, wie das Vitamin-D2-Synthase-Enzym. Dieses Enzym kann durch gentechnische Methoden in Mikroorganismen exprimiert und durch Reinigung und Konzentration gewonnen werden.

##### Dritter Schritt: Enzymatische Umwandlung

Das vorbereitete Hefegemisch wird mit einer angemessenen Menge an Enzymlösung gemischt. Die Reaktionstemperatur, der pH-Wert und die Reaktionszeit werden kontrolliert, um die enzymatische Umwandlung von Ergosterol in Vitamin D2 zu ermöglichen. Die spezifischen Reaktionsbedingungen können optimiert werden, abhängig von den Eigenschaften des Enzyms und der Beschaffenheit des Rohmaterials.

##### Vierter Schritt: Extraktion und Reinigung

Nach der enzymatischen Umwandlung wird Vitamin D2 durch geeignete Extraktionslösungsmittel und -bedingungen aus dem Reaktionssystem extrahiert. Anschließend werden durch Methoden wie Chromatographie und Kristallisation Verunreinigungen entfernt und die Reinheit von Vitamin D2 erhöht.

##### Fünfter Schritt: Trocknung und Verpackung

Das gereinigte Vitamin D2 wird getrocknet, um Feuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird es in geeignete Verpackungsmaterialien verpackt, um die Hygiene und Sicherheit des Produkts zu gewährleisten. Es wird in einer kühlen, trockenen Umgebung gelagert, um Feuchtigkeitseinwirkung und Lichteinfluss zu vermeiden.

##### Sechster Schritt: Qualitätskontrolle

Die hergestellten Vitamin-D2-Produkte werden auf Qualität geprüft, einschließlich Reinheit, Gehalt und Aktivität. Durch Vergleiche mit Standardprodukten wird sichergestellt, dass die Produktqualität den relevanten Standards und Anforderungen entspricht.

#### Vergleichsbeispiel Zwei

Vorschlag für ein photobiologisches Herstellungsverfahren für Vitamin D2, das die folgenden Schritte umfasst:

##### Erster Schritt: Rohstoffvorbereitung

Auswahl von Pflanzenblättern oder Mikroorganismen, die reich an Ergosterol sind, als Rohstoff. Die Rohstoffe werden gereinigt, zerkleinert und vorbehandelt, um sie für die nachfolgende photobiologische Synthese vorzubereiten. LU507172

**Zweiter Schritt: Optimierung der Lichtbedingungen**

Durch Anpassung der Lichtintensität, Wellenlänge und Beleuchtungsdauer werden die Bedingungen für die photobiologische Synthese optimiert. Auswahl geeigneter Lichtquellen und Beleuchtungsgeräte, um die Stabilität und Gleichmäßigkeit der Lichtquelle sicherzustellen.

**Dritter Schritt: Photobiologische Synthesereaktion**

Die vorbereiteten Rohstoffe werden unter Lichtbedingungen platziert, wodurch Ergosterol unter dem Einfluss von Licht in Vitamin D2 umgewandelt wird. Durch Kontrolle der Lichtbedingungen und der Reaktionszeit wird eine effiziente photobiologische Synthese erreicht.

**Vierter Schritt: Extraktion und Reinigung**

Nach der photobiologischen Synthesereaktion wird Vitamin D2 mittels geeigneter Extraktionslösungsmittel und -methoden aus dem Rohstoff extrahiert. Anschließend werden durch chromatographische Trennung, Kristallisation und andere Reinigungstechniken Verunreinigungen entfernt und die Reinheit von Vitamin D2 erhöht.

**Fünfter Schritt: Trocknung und Verpackung**

Das gereinigte Vitamin D2 wird getrocknet, um Feuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird es in gut versiegelbaren Verpackungsmaterialien verpackt, um die Hygiene und Sicherheit des Produkts zu gewährleisten. Es wird in einer kühlen, trockenen Umgebung gelagert, um vor Feuchtigkeit und Licht geschützt zu sein.

**Sechster Schritt: Qualitätskontrolle**

Qualitätsprüfungen werden für die hergestellten Vitamin-D2-Produkte durchgeführt, einschließlich Reinheit, Gehalt und Aktivität. Durch den Vergleich mit Standardprodukten wird sichergestellt, dass die Produktqualität den relevanten Standards und Anforderungen entspricht.

Es wurde festgestellt, dass Ausführungsbeispiel Zwei das beste Ergebnis liefert, indem ein Genexpressionsvektor konstruiert, Pilzzellen transformiert und Transformanten mit hoher Synthesefähigkeit ausgewählt und identifiziert werden. Dies erhöht die Genexpression, die mit der Synthese von Ergosterol und der Umwandlung in Vitamin D2 zusammenhängt, und züchtet essbare Pilzsorten mit höheren Ergosterolgehalten, um die Produktion und Effizienz von Vitamin D2 zu verbessern. Dies löst weiterhin das Problem der unzureichenden Rohstoffoptimierung bei der bestehenden Vitamin-D2-Extraktion; es ermöglicht die Optimierung der genetischen Eigenschaften der Rohstoffe, um die Vitamin-D2-Extraktionsrate zu erhöhen.

Obwohl Beispiele und Beschreibungen dieser Erfindung dargestellt wurden, kann von Fachleuten auf diesem Gebiet verstanden werden, dass verschiedene Änderungen, Modifikationen, Substitutionen und Varianten möglich sind, ohne von den Prinzipien und dem Geist der Erfindung abzuweichen, wie sie durch die beigefügten Ansprüche und deren Äquivalente definiert sind.

**Ansprüche**

LU507172

1. Ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, durch gekennzeichnet folgende Schritte:
- 5      Rohstoffvorbereitung, Auswahl von essbaren Pilzen mit hohem Ergosterolgehalt als Rohstoff; Kultivierung und Optimierung, gentechnische Modifikation der fermentierten und kultivierten essbaren Pilze;
- 10     Lichtumwandlung, Bestrahlung der Kulturen mit Ultraviolettlicht;
- 15     Extraktion und Reinigung, Verwendung von Nanotechnologie zur Reinigung von Vitamin D2.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, durch gekennzeichnet die spezifische Durchführung der Rohstoffvorbereitung:
- 15     Auswahl von essbaren Pilzen mit hohem Ergosterolgehalt als Rohstoff zur Herstellung von Vitamin D2.
- 20     3. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, durch gekennzeichnet die spezifische Durchführung der Kultivierung und Optimierung:
- 20     Inokulation von Pilzen in ein Nährmedium, das Kohlenstoffquelle, Stickstoffquelle sowie Mineralien und Spurenelemente enthält, Kontrolle des pH-Wertes des Mediums auf neutral oder leicht sauer, Platzierung des Kulturgefäßes auf einem konstanten Temperaturschüttler oder in einem Fermenter, Einstellung der geeigneten Temperatur auf 25-30° C;
- 25     Konstruktion eines Genexpressionsvektors, Transformation der Pilzzellen sowie Auswahl und Identifikation von Transformanten mit hoher Syntheseleistung, Erhöhung der Genexpression, die mit der Synthese von Ergosterol und der Umwandlung zu Vitamin D2 verbunden ist.
- 30     4. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, durch gekennzeichnet die spezifische Durchführung der Lichtumwandlung:
- 30     Während des Kultivierungsprozesses der Pilze werden diese einer Ultraviolettbestrahlung ausgesetzt, mit einer Lichtintensität von 10 Watt pro Quadratmeter und einer Bestrahlungszeit von sechs bis vierzehn Stunden.
- 35     5. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, durch gekennzeichnet die spezifische Durchführung der Extraktion und Reinigung:
- 35     Durch Zerkleinern werden die Zellwände der Pilze aufgebrochen, um Vitamin D2 freizusetzen, das dann mit Ethanol extrahiert wird;
- 40     Verwendung von Nanofiltrationsmembranen oder Nanoabsorbentien zur Filtration und Adsorption des Extrakts, um Unreinheiten zu entfernen und die Reinheit von Vitamin D2 zu erhöhen;
- 40     Nach der Extraktion und Reinigung wird die Vitamin D2-Lösung kristallisiert, die Kristalle werden durch Zentrifugation von der Mutterlauge getrennt und durch Trocknung entwässert.
- 45     6. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Vitamin D2 aus essbaren Pilzen, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, durch gekennzeichnet:
- 45     Das getrocknete Vitamin D2 wird zermahlen und in gut verschließbaren

Verpackungsbehältern abgefüllt, um die Hygiene und Sicherheit des Produkts zu gewährleisten. LU507172

7. Die Verwendung von Vitamin D2, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-6, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, dadurch gekennzeichnet, dass das hergestellte Vitamin D2 zur Förderung der Kalziumaufnahme verwendet wird.

8. Die Verwendung von Vitamin D2, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-6, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, dadurch gekennzeichnet, dass das hergestellte Vitamin D2 zur Vorbeugung von Rachitis verwendet wird.

10 9. Die Verwendung von Vitamin D2, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-6, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, dadurch gekennzeichnet, dass das hergestellte Vitamin D2 zur Stärkung der Immunabwehr verwendet wird.

15 10. Die Verwendung von Vitamin D2, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-6, das die Kalziumaufnahme fördert, Rachitis vorbeugt und das Immunsystem stärkt, dadurch gekennzeichnet, dass das hergestellte Vitamin D2 gleichzeitig zur Förderung der Kalziumaufnahme, zur Vorbeugung von Rachitis und zur Stärkung der Immunabwehr verwendet wird..