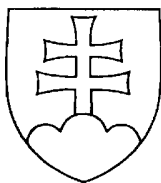


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **20. 2. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **101 08 223.1**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **21. 2. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 2. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/EP02/01766**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO02/066666**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1045-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

C12P 13/02,
A23K 1/00
/(C12P 13/02,
C12R 1:125)

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

(72) Pôvodca: **Baldenius Kai-Uwe, Ludwigshafen, DE;**
Beck Christine, Mannheim, DE;
Fischer Andreas, Ludwigshafen, DE;
Harz Hans-Peter, Dudenhofen, DE;
Lohscheidt Markus, Mannheim, DE;
Leemann Martin, Bensheim, DE;

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

(54) Názov: **Príprava kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí ako prísad do krmív**

(57) Anotácia:

Opísaný postup na prípravu kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí je založený na použití mikroorganizmu, ktorý produkuje kyselinu D-pantoténovú v množstve 2 g/l, má deregulovanú biosyntézu kyseliny pantoténovej a/alebo izoleucínu alebo valínu, pričom sa počas kultivácie pridáva do média 0 až 20 g/l β-alanínu a/alebo jeho solí. Ďalej prechádza fermentačný roztok obsahujúci D-pantotenát cez jednu alebo viacero iónovo selektívnych membrán aplikovaním elektrického poľa, pričom sa z roztoku odstraňujú nízkomolekulové ióny za tvorby voľnej kyseliny D-pantoténovej, potom sa pridáva vápenatá a/alebo horečnatá báza na úpravu pH na hodnotu 3 až 10 a roztok obsahujúci uvedené soli kyseliny D-pantoténovej sa podrobí sušeniu a formulácii. Je uvedené tiež použitie takto pripravenej kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí ako prísad do krmív.

SK 1045-2003 A3

Príprava kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí ako prísad do krmív

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka zlepšeného postupu na prípravu kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí a ich použitia ako prísad do krmív.

Ako východisková látka biosyntézy koenzýmu A je D-pantotenát široko rozšírený vo flóre a faune. Na rozdiel od ľudí, ktorí konzumujú dostatočné množstvá kyseliny pantoténovej v potrave, symptómy nedostatku D-pantotenátu sú často opisované nielen pre rastliny ale aj pre zvieratá. Dostupnosť D-pantotenátu je preto ekonomicky veľmi zaujímavá, najmä v odvetví živočíšnych krmív.

Doterajší stav techniky

D-pantotenát sa konvenčne pripravuje chemickou syntézou z D-pantolaktónu a β -alaninátu vápenatého (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6. vydanie, 1999, elektronická verzia, kapitola „Vitamins“). Príprava D-pantolaktónu vyžaduje zložité, klasické štiepenie racemátu cez diastereoméne soli. Komerčným produktom chemickej syntézy je zvyčajne vápenatá soľ kyseliny D-pantoténovej, D-pantotenát vápenatý.

V porovnaní s chemickou syntézou je výhodou biotechnologických výrobných procesov použitím mikroorganizmov selektívna (enantioméne čistá) produkcia D formy kyseliny pantoténovej, ktorú možno použiť pre vyššie organizmy. Zložité štiepenie racemátu, ktoré vyžaduje chemická syntéza, takto nie je potrebné.

Je známych mnoho postupov na prípravu kyseliny D-pantoténovej použitím mikroorganizmov vrátane postupov v 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.

EP 1 006 189 a EP 1 001 027 opisujú postupy na prípravu pantotenátu, v ktorom sa dosahuje obsah najviac 1 g/l kyseliny D-pantoténovej vo fermentačnom

roztoku. Taký nízky obsah kyseliny pantoténovej vo fermentačnom roztoku, teda menej ako 10 % hmotnostných vzhľadom na obsah tuhých látok, je však nevhodný na hospodárnu výrobu krmivových doplnkov obsahujúcich kyselinu D-pantoténovú. Ďalšou nevýhodou doposiaľ opísaných postupov je, že izolovanie produktu z fermentačného média vyžaduje početné spracovacie kroky. Ekonomický postup prípravy v priemyselnom meradle nie je známy.

Nemecká prihláška vyložená na verejné nahliadnutie DE 100 16 321 opisuje fermentačný postup na prípravu krmivového doplnku obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú. Významnou nevýhodou tohto postupu ako aj vyššie opísaných fermentačných postupov na prípravu kyseliny D-pantoténovej však je, že prekursor kyseliny pantoténovej, β -alanín, sa musí dodávať mikroorganizmu prostredníctvom fermentačného média, aby sa získali ekonomické výťažky požadovaného produktu.

Okrem toho US 6,013,492 a WO 96/332839 opisujú spracovanie kyseliny D-pantoténovej z fermentačného roztoku odfiltrovaním nerozpustných zložiek (napríklad bunkového materiálu), adsorbovaním filtrátu na aktívne uhlie, následne elúciou kyseliny D-pantoténovej organickým rozpúšťadlom, s výhodou metanolom, neutralizovaním hydroxidom vápenatým a následne vykryštalizovaním D-pantotenátu vápenatého. Významnými nevýhodami sú straty hodnotného produktu, ku ktorým dochádza počas kryštalizácie, a použitie organického rozpúšťadla, ktoré možno z produktu odstrániť len s ťažkosťami a ktoré vyžaduje zložitý krok regenerácie rozpúšťadla.

EP 0 590 857 opisuje fermentačný postup na prípravu kyseliny D-pantoténovej, pri ktorom kultivovanie mikroorganizmu vyžaduje prísun β -alanínu. Fermentačný roztok sa prefiltruje, aby sa oddelila biomasa, potom prejde cez kationomenič a potom aniónomenič, neutralizuje sa hydroxidom vápenatým, nakoncentruje odparením, pridá sa aktívne uhlie, prefiltruje sa ešte raz a kryštalizuje sa s prídavkom metanolu a chloridu vápenatého. Výsledný produkt obsahujúci pantotenát popri kyseline D-pantoténovej vo forme vápenatej soli obsahuje aj chlorid vápenatý v molárnom pomere 1:1. Zníženie obsahu chloridu vápenatého vyžaduje elektrodialýzu s následným

sušením rozprašovaním. Tento postup má tú nevýhodu, že nie je hospodárny ani ekologický vzhľadom na množstvo zložitých procesných krokov a použitie organických rozpúšťadiel.

Podstata vynálezu

Cieľom predloženého vynálezu je poskytnúť krmivový doplnok obsahujúci kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli a jej prípravu zlepšeným postupom na prípravu kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí, ktorý nemá vyššie uvedené nevýhody. Z ekonomických dôvodov je tu vhodný postup, pri ktorom je prísun β -alanínu výrazne znížený alebo vôbec nepotrebný. Okrem toho je vhodná príprava kyseliny D-pantoténovej vo forme jej dvojmocných solí a najmä solí kovov alkalických zemín, keďže dvojmocné soli majú menšie hygroskopické charakteristiky ako jednomocné soli kyseliny pantoténovej a teda majú menej výraznú tendenciu k agregácii pri ďalšom použití napríklad ako krmivového doplnku.

Zistili sme, že tento cieľ sa s výhodou dosiahne predloženým vynálezom.

Predložený vynález sa týka postupu na prípravu kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí, ktorý zahŕňa

a) použitie aspoň jedného organizmu, ktorý produkuje kyselinu D-pantoténovú a v ktorom je biosyntéza kyseliny pantoténovej (pan) a/alebo izoleucínu/valínu (ilv) deregulovaná a ktorý tvorí aspoň 2 g/l solí kyseliny D-pantoténovej fermentáciou v kultivačnom médiu, pričom sa do kultivačného média dodáva 0 – 20 g/l voľného β -alanínu a/alebo soli β -alanínu,

b) prechod fermentačného roztoku obsahujúceho D-pantotenát cez jednu alebo viacero iónovo selektívnych membrán aplikovaním elektrického poľa, pričom sa z roztoku obsahujúceho D-pantotenát odstraňujú nízkomolekulové ióny,

c) pridanie vápenatej bázy a/alebo horečnatej bázy, aby sa voľná kyselina D-pantoténová obsiahnutá v roztoku upravila na pH 5 – 10, pričom sa získa roztok, ktorý obsahuje pantotenát vápenatý a/alebo horečnatý, a

d) podrobenie roztoku obsahujúceho pantotenát vápenatý a/alebo pantotenát horečnatý sušeniu a/alebo formulácii.

Vo variante postupu podľa vynálezu sa v kroku c) alebo d) získava alebo nanáša suspenzia, ktorá obsahuje pantotenát vápenatý a/alebo horečnatý.

Fermentáciu prebiehajúcu v kroku a) podľa vynálezu možno ďalej uskutočňovať použitím postupov, ktoré sú všeobecne známe, v dávkovom, prísunovom dávkovom alebo opakovanom prísunovom dávkovom režime alebo kontinuálne. Získaná kyselina pantoténová sa v tomto prípade neutralizuje konvenčnými tlmivými systémami, napríklad fosfátovým tlmivým roztokom obsahujúcim NaOH, KOH alebo amoniak.

V iných variantoch postupu podľa vynálezu sa v kultivačnom médiu fermentáciou vytvorí v kroku a) najmenej 10 g/l, s výhodou najmenej 20 g/l, s osobitnou výhodou najmenej 40 g/l, s veľmi osobitnou výhodou najmenej 60 g/l a s najväčšou výhodou najmenej 70 g/l solí kyseliny D-pantoténovej.

Na účely predloženého vynálezu formy slova „produkovať“ znamenajú, že organizmus dokáže syntetizovať väčšie množstvá kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí, ako je potrebné na jeho vlastné metabolické potreby. Vo výhodnom variante vynálezu množstvo kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí nie je prítomné vo vnútri bunky, ale organizmus ho ideálne úplne uvoľňuje do kultivačného média. Toto uvoľňovanie môže byť aktívne alebo pasívne pomocou mechanizmov, ktoré sú samy osebe známe.

Podľa vynálezu sú použitými organizmami produkujúcimi kyselinu D-pantoténovú mikroorganizmy. Podľa vynálezu medzi ne patria plesne, kvasinky a/alebo baktérie. Podľa vynálezu je výhodné použitie plesní, napríklad plesne hlavičkatej, alebo kvasiniek, napríklad *Saccharomyces* alebo *Debaromyces*, a z týchto s výhodou *Saccharomyces cerevisiae*. S výhodou sa podľa vynálezu používajú koryneformné baktérie alebo *Bacillaceae*. Tie, ktoré sú v rozsahu vynálezu, sú s výhodou napríklad baktérie rodov *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Bevibacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*,

Acinetobacter alebo Rhizobium. Osobitne výhodné sú tu Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium breve alebo Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. amyloliquefaciens, B. cereus, B. lentimorbus, B. lentus, B. firmus, B. pantothenicus, B. circulans, B. coagulans, B. megaterium, B. pumilus, B. thuringiensis, B. brevis, B. stearothermophilus a iné druhy Bacillus skupiny 1, ktoré sú charakterizované svojou 16sRNA, alebo Actinum mycetalis. Tento zoznam slúži na vysvetlenie a v žiadnom prípade neobmedzuje predložený vynález.

Predložený vynález ďalej zahŕňa použitie geneticky modifikovaných organizmov na prípravu krmivového doplnku obsahujúceho voľnú kyselinu D-pantoténovú a/alebo jej soli podľa vynálezu. Také geneticky modifikované organizmy možno izolovať napríklad chemickou mutagénizáciou a následnou selekciou použitím vhodného „skriningového procesu“. Podľa vynálezu sú tu zahrnuté aj „produkčné kmene“, ktoré sú vhodné na prípravu produktu v zmysle predloženého vynálezu a majú genetické modifikácie vzhľadom na metabolický tok v smere kyseliny D-pantoténovej, modifikácie vzhľadom na uvoľňovanie kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí cez bunkovú membránu. Toto možno dosiahnuť napríklad modifikáciami v kľúčových pozíciách v relevantných metabolických biosyntetických dráhach použitého organizmu.

Je tiež možné použiť transgénne organizmy, ktoré pochádzajú z transferu homologických alebo heterologických nukleotidových sekvencií, ktoré sú potrebné, alebo môžu byť potrebné na syntetizovanie požadovaného produktu. V tomto prípade je možná nadmerná expresia a/alebo deregulácia jedného alebo viacerých génov jednotlivo a/alebo v kombinácii lokalizovaných v genóme a/alebo na vektore.

Transgénne organizmy tohto typu môžu s výhodou obsahovať ďalšie kópie a/alebo geneticky modifikované gény vybrané zo skupiny, ktorú tvorí panB, panC, panD, panE a/alebo ich kombinácie a/alebo dokonca organizačné jednotky, ktoré obsahujú operón panBCD. Okrem toho možno v organizmoch s výhodou manipulovať iné metabolické dráhy, napríklad dráhu biosyntézy izoleucínu-valínu, ako je opísané napríklad v EP 1 006 189, EP 1 006 192, EP 1 006 193 alebo EP 1 001 027. V dôsledku toho sa stále viac sprístupňujú rozvetvené prekursorové látky biosyntézy

kyseliny pantoténovej. Ak je to vhodné, s výhodou sa gény pre túto biosyntetickú dráhu, t.j. *ilvB*, *ilvN*, *ilvC* a/alebo *ilvD*, exprimujú nadmerne.

Okrem toho vynález pokrýva genetické modifikácie aspartát α -dekarboxylázy (*panD*), napríklad prostredníctvom nadmernej expresie alebo deregulácie v použitom organizme produkujúcom kyselinu D-pantoténovú.

Na účely predloženého vynálezu slovo „deregulácia“ znamená zmenenie alebo modifikovanie aspoň jedného génu, ktorý kóduje jeden enzým v biosyntetickej metabolickej dráhe, takže aktivita enzýmu v mikroorganizme sa zmení alebo modifikuje. Je výhodné, aby sa aspoň jeden gén, ktorý kóduje jeden enzým biosyntetickej metabolickej dráhy, zmenil tak, že génový produkt sa tvorí vo zvýšenej miere, alebo má zvýšenú aktivitu. Pojem „deregulovaná metabolická dráha“ zahŕňa aj biosyntetickú metabolickú dráhu, v ktorej je zmenený alebo modifikovaný viac ako jeden gén, ktorý kóduje viac ako jeden enzým, takým spôsobom, že sa zmení alebo modifikuje aktivita viac ako jedného enzýmu.

Zmeny alebo modifikácie môžu zahŕňať okrem iných nasledujúce: odstránenie endogénneho promótoru alebo regulačných prvkov; zavedenie silných promótorov, indukateľných promótorov alebo viacerých promótorov súčasne; odstránenie regulačných sekvencií tak, že sa zmení expresia génového produktu; zmenenie chromozomálnej pozície génu; zmena DNA sekvencie v blízkosti génu alebo v rámci génu, napríklad ribozomálnych väzobných miest (RBS); zvýšenie počtu kópií génu v genóme alebo zavedením rôzneho počtu kópií plazmidov; modifikovanie proteínov (napr. regulačných proteínov, zoslabovačov, zosilňovačov, transkripčných aktivátorov a podobne), ktoré hrajú úlohu v transkripcii génu a/alebo v translácii za vzniku génového produktu. To zahŕňa všetky ostatné možnosti deregulácie expresie génov, ktoré patria do doterajšieho stavu techniky, napríklad použitie antisense oligonukleotidov alebo blokovanie represorových proteínov.

Deregulácia môže zahŕňať aj zmeny kódovacieho regiónu génov, ktoré vedú napríklad k odstráneniu spätnoväzobnej regulácie v génovom produkte alebo k vyššej alebo nižšej špecifickej aktivite génového produktu.

Ďalej sú výhodné genetické modifikácie enzýmov podľa vynálezu, ktoré ovplyvňujú výstup prekursorov kyseliny pantoténovej a/alebo tok kyseliny pantoténovej za vzniku koenzýmu A. Medzi príklady génov kódujúcich také enzýmy patria: *alsD*, *avtA*, *ilvE*, *ansB*, *coaA*, *coaX* atď. Tento zoznam slúži na vysvetlenie a v žiadnom prípade neobmedzuje predložený vynález.

Okrem toho sú výhodné genetické modifikácie, ktoré zabezpečujú bunkovú produkciu kofaktorov (napr. metyléntetrahydrofolátu, redox ekvivalentov a podobne) v množstve, ktoré je optimálne pre produkciu kyseliny pantoténovej.

Takto je β -alanín s výhodou už prítomný v bunkách vo zvýšených koncentráciách v porovnaní so zodpovedajúcimi geneticky nemodifikovanými organizmami, a preto ho netreba pridávať do kultivačného média ako prekursor, ako je to potrebné napríklad v EP-A 0 590 857. Výhodné sú mikroorganizmy, v ktorých je biosyntéza kyseliny pantoténovej (*pan*) a/alebo izoleucín-valínu (*ilv*) a/alebo asparát- α -dekarboxylázy (*panD*) deregulovaná. Navyše je výhodná ďalšia nadmerná expresia ketopantoát reduktázy (*panE*) v mikroorganizmoch.

Ďalej je podľa vynálezu výhodné, ak je to vhodné, aby gén *coaA*, ktorý je potrebný na syntézu koenzýmu A, mal zníženú aktivitu, alebo bol úplne vypnutý (napríklad v druhoch *Bacillus*). Je to preto, lebo *Bacillus* popri *coaA* obsahuje ďalší gén na túto enzymatickú funkciu (= *coaX*). Aktivita tohto génu *coaX* alebo zodpovedajúceho enzýmu môže byť tiež zmenená, s výhodou znížená alebo dokonca odstránená za predpokladu, že *coaA* samotný ešte má dostatočnú enzýmovú aktivitu, hoci zníženú enzýmovú aktivitu, teda enzýmová aktivita *coaA* sa nestratí úplne. Popri nadmernej expresii rôznych génov je výhodná aj genetická manipulácia promótorových regiónov týchto génov za predpokladu, že táto manipulácia vedie k nadmernej expresii génových produktov.

V uskutočnení predloženého vynálezu sú použité bakteriálne kmene opísané podľa prílohy (PCT/US prihláška 0025993), napríklad *Bacillus subtilis* PA 824 a/alebo ich deriváty. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu je použitý mikroorganizmus *Bacillus*

Bacillus subtilis PA 668 podľa opisu v prílohe (US č. 60/262,995). Tieto kmene *Bacillus subtilis* PA 824 a PA 668 boli pripravené nasledovne:

Vychádzajúc z kmeňa *Bacillus subtilis* 168 (kmeň Marburg ATCC 6051), ktorý má genotyp *trpC2* (Trp^-), kmeň PY79 bol pripravený transdukciou Trp^+ markera (z *Bacillus subtilis* štandardného typu W23). Klasické metódy genetického inžinieringu (opísané napríklad v monografii Harwood, C. R. a Cutting, S. M. (editors), *Molecular Biological Methods for Bacillus* (1990) John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England) zaviedli mutácie ΔpanB a ΔpanE1 do kmeňa PY79.

Výsledný kmeň bol transformovaný použitím genomickej DNA kmeňa *Bacillus subtilis* PA221 (genotyp $P_{26}\text{panBCD}$, *trpC2* (Trp^-)) a genomickej DNA kmeňa *Bacillus subtilis* PA303 (genotyp $P_{26}\text{panE1}$). Výsledný kmeň PA327 má genotyp $P_{26}\text{panBCD}$, $P_{26}\text{panE1}$ a je tryptofánovým auxotrofom (Trp^-). Titre kyseliny pantoténovej až do 3,0 g/l (24 h) sa dosiahli použitím kmeňa *Bacillus subtilis* PA327 v 10 ml kultúrach obsahujúcich médium SVY (25 g/l Difco Veal Infusion Broth, 5 g/l Difco Yeast Extract, 5 g/l glutamátu sodného, 2,7 g/l síranu amónneho v 740 ml vody, zmes sa autoklávovala a pridalo sa 200 ml 1 M fosforečnanu draselného s pH 7,0 a 60 ml 50 % sterilného roztoku glukózy), ktoré bolo suplementované 5 g/l β -alanínu a 5 g/l α -ketoizovalerátu.

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

Klasické metódy genetického inžinieringu sa použili na klonovanie operónu *panBCD* pre *Bacillus*, s pomocou sekvenčnej informácie operónu *panBCD* pre *E. coli* (pozrite Merkel et al., FEMS Microbiol. Lett., 143, 1996:247-252) vychádzajúc z plazmidovej knižnice *Bacillus subtilis* GP275. Pri klonovaní sa použil kmeň *E. coli* BM4062 (bir^{ts}) a informácia, že operón *Bacillus* je blízko génu *birA*. Operón *panBCD* sa zaviedol do plazmidu, ktorý možno replikovať v *E. coli*. Aby sa zlepšila expresia operónu *panBCD*, použili sa silné konštitutívne promótor fágov *Bacillus subtilis* SP01 (P_{26}) a ribozómové väzobné miesto (=RBS) pred génom *panB* bolo nahradené umelým RBS. DNA fragment, ktorý je bezprostredne *upstream* od natívneho génu *panB*

v *Bacillus*, bol ligovaný pred kazetu $P_{26}panBCD$ na plazmide. Tento plazmid bol transformovaný na kmeň *Bacillus subtilis* RL-1 (derivát *Bacillus subtilis* 168 získaný klasickou mutagenézou (kmeň Marburg ATCC 6051), genotyp *trpC2* (Trp^-)), a homologickou rekombináciou bol natívny operón *panBCD* nahradený operónom $P_{26}panBCD$. Výsledný kmeň sa nazýva PA221 a má genotyp $P_{26}panBCD$, *trpC2* (Trp^-).

Titer kyseliny pantoténovej až do 0,92 g/l (24 h) sa dosiahol použitím kmeňa *Bacillus subtilis* PA221 v 10 ml kultúr obsahujúcich médium SVY, ktoré bolo suplementované 5 g/l β -alanínu a 5 g/l α -ketoizovalerátu.

Produkcia kmeňa *Bacillus subtilis* PA303 (genotyp $P_{26}panE1$) je opísaná v nasledujúcej časti:

Použitím génovej sekvencie *E. coli panE* sa klonovala sekvencia *Bacillus panE* analógiou. Zistilo sa, že v *B. subtilis* existujú dva homológy génu *E. coli panE*, ktoré boli označené *panE1* a *panE2*. Analýzami deléciou sa zistilo, že gén *panE1* je zodpovedný za 90 % produkcie kyseliny pantoténovej, zatiaľ čo delécia génu *panE2* nemala žiadny významný efekt na produkciu kyseliny pantoténovej. Aj tu, podobne ako pri klonovaní operónu *panBCD*, sa promótor nahradil silným konštitutívnym promótorom P_{26} a ribozómové väzobné miesto pred génom *panE1* sa nahradilo umelým väzobným miestom. Fragment $P_{26}panE1$ sa klonoval do vektoru, ktorý bol konštruovaný tak, že fragment $P_{26}panE1$ sa mohol integrovať do pôvodného lokusu *panE1* v génóme *Bacillus subtilis*. Kmeň získaný po transformácii a homologickej rekombinácii sa označuje PA303 a má genotyp $P_{26}panE1$. Titer kyseliny pantoténovej až do 1,66 g/l (24 h) sa dosiahol použitím kmeňa *Bacillus subtilis* PA303 v 10 ml kultúr obsahujúcich médium SVY, ktoré bolo suplementované 5 g/l β -alanínu a 5 g/l α -ketoizovalerátu.

Kmeň bol ďalej konštruovaný transformovaním PA327 plazmidom, ktorý obsahoval operón $P_{26}ilvBNC$ a markerový gén pre spektinomycín. Operón $P_{26}ilvBNC$ sa integroval do lokusu *amyE*, čo bolo demonštrované pomocou PCR. Jeden transformant bol označený PA340 (genotyp $P_{26}panBCD$, $P_{26}panE1$, $P_{26}ilvBNC$, *specR*, *trpC2* (Trp^-)).

Titer kyseliny pantoténovej až do 3,6 g/l (24 h) sa dosiahol použitím kmeňa *Bacillus subtilis* PA340 v 10 ml kultúrach obsahujúcich médium SVY, ktoré bolo suplementované len 5 g/l β -alanínu; v 10 ml kultúrach obsahujúcich médium SVY, ktoré bolo suplementované 5 g/l β -alanínu a 5 g/l β -ketoizovalerátu, sa dosiahol titer kyseliny pantoténovej až do 4,1 g/l (24 h).

Okrem toho sa zaviedla deregulovaná kazeta *ilvD* do kmeňa PA340. S týmto cieľom sa plazmid, ktorý obsahuje gén *ilvD* pod kontrolou promótora P_{26} obsahujúceho umelý RBS2, transformoval do PA340. Gén $P_{26}ilvD$ bol integrovaný do pôvodného lokusu *ilvD* homologickou rekombináciou. Výsledný kmeň PA374 má genotyp $P_{26}panBCD$, $P_{26}panE1$, $P_{26}ilvBNC$, $P_{26}ilvD$, *specR* a *trpC2* (Trp^-).

Titer kyseliny pantoténovej až do 2,99 g/l (24 h) sa dosiahol použitím kmeňa *Bacillus subtilis* PA374 v 10 ml kultúrach obsahujúcich médium SVY, ktoré bolo suplementované len 5 g/l β -alanínu.

Aby sa produkovala kyselina pantoténová použitím kmeňa PA374 bez prísunu β -alanínu, do kmeňa PA374 sa zaviedli ďalšie kópie génu *panD* kódujúceho aspartát- α -dekarboxylázu. S týmto cieľom sa chromozomálna DNA kmeňa PA401 transformovala do PA374. Kmeň PA377 sa získal selekciou na tetracyklín.

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

Titer kyseliny pantoténovej až do 1,31 g/l (24 h) sa dosiahol bez prísunu prekursorov použitím kmeňa *Bacillus subtilis* PA377 v 10 ml kultúrach obsahujúcich médium SVY.

Príprava kmeňa *Bacillus subtilis* PA401 (genotyp $P_{26}panD$) je opísaná v nasledujúcej časti:

Gén *Bacillus subtilis panD* bol klonovaný z operónu *panBCD* do vektora, ktorý prenáša tetracyklínový markerový gén. Promótor P_{26} a vyššie opísané RBS boli klonované pred gén *panD*. Reštrikčnou digesciou sa získal fragment, ktorý obsahoval

tetracyklínový markerový gén a gén $P_{26}panD$. Tento fragment bol religovaný a transformovaný do vyššie opísaného kmeňa PA221. Fragment sa integroval do genómu kmeňa PA211. Výsledný kmeň PA401 má genotyp $P_{26}panBCD$, $P_{26}panD$, tetR a *trpC2* (Trp⁻).

Titer kyseliny pantoténovej až do 0,3 g/l (24 h) sa dosiahol použitím kmeňa *Bacillus subtilis* PA401 v 10 ml kultúrach obsahujúcich médium SVY, ktoré bolo suplementované 5 g/l α -ketoizovalerátu. V 10 ml kultúrach obsahujúcich médium SVY, ktoré bolo suplementované 5 g/l kyseliny D-pantoovej a 10 g/l L-aspartátu, sa získali titre kyseliny pantoténovej až do 2,2 g/l (24 h).

Vychádzajúc z kmeňa PA377 sa generoval tryptofán-prototrofský kmeň transformáciou chromozomálnou DNA z kmeňa PY79. Tento kmeň PA824 má genotyp $P_{26}panBCD$, $P_{26}panE1$, $P_{26}ilvBNC$, $P_{26}ilvD$, specR, tetR a Trp⁺.

Dosiahol sa titer kyseliny pantoténovej až do 4,9 g/l (48 h) bez prísunu prekursorov použitím kmeňa *Bacillus subtilis* PA824 v 10 ml kultúrach v médiu SVY (porovnanie s PA377: do 3,6 g/l za 48 h).

Príprava PA668 je opísaná v nasledujúcej časti:

Gén *Bacillus panB* bol klonovaný z operónu *panBCD* štandardného typu a vložený do vektora, ktorý popri géne chloramfenikolovej rezistencie obsahuje aj sekvencie *B. subtilis* pre lokus *vpr*.

Silný konštitutívny promótor P_{26} bol zavedený pred koniec 5' génu *panB*. Jeden fragment, ktorý obsahuje gén $P_{26}panB$, markerový gén pre chloramfenikolovú rezistenciu a tiež sekvencie *Bacillus subtilis* *vpr* bol získaný reštrikčnou digesciou. Izolovaný fragment bol religovaný a použitý na transformovanie kmeňa PA824. Výsledný kmeň bol označený PA668. Genotyp PA668 je: $P_{26}panBCD$, $P_{26}panE1$, $P_{26}ilvBNC$, $P_{26}ilvD$, $P_{26}panB$, specR, tetR, CmR a Trp⁺.

Boli izolované dve kolónie PA668 a označené PA668-2A a druhá PA668-24.

Použitím kmeňa *B. subtilis* PA668-2A sa dosahujú titre kyseliny pantoténovej 1,5 g/l za 48 h v 10 ml kultúrach v médiu SVY bez prísunu prekursorov. V 10 ml kultúrach suplementovaných 10 g/l aspartátu sa dosahujú titre až do 5 g/l.

Použitím kmeňa *B. subtilis* PA668-24 sa dosahujú titre kyseliny pantoténovej 1,8 g/l za 48 h v 10 ml kultúrach v médiu SVY bez prísunu prekursorov. V 10 ml kultúrach suplementovaných 10 g/l L-aspartátu sa dosahujú titre až do 4,9 g/l.

Presná konštrukcia kmeňa pochádza z príloh prihlášky PCT/US 0025993 a US č. 60/262,995.

Použitím vyššie opísaného kmeňa PA377 v glukózovo obmedzenej fermentácii v médiu SVY (25 g/l Difco Veal Infusion Broth, 5 g/l Difco Yeast Extract, 5 g/l tryptofánu, 5 g/l glutamátu sodného, 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1 ml/l roztoku stopových solí s nasledujúcim zložením: 0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g H_3BO_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 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, doplnené do 1 l vodou)) v 10 l škále s kontinuálnym prísunom glukózového roztoku sa získajú koncentrácie kyseliny pantoténovej vo fermentačnej zmesi 18 – 19 g/l 122 – 125 g/l) za 36 h (48 h).

V prípade glukózovo obmedzenej fermentácie PA824, tryptofán-prototrofného derivátu PA377, v médiu kvasnicového extraktu (10 g/l Difco Yeast Extract, 5 g/l glutamátu sodného, 8 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1 ml/l vyššie opísaného roztoku stopových solí) sa získajú nasledujúce koncentrácie kyseliny pantoténovej vo fermentačných zmesiach za 36 h, 48 h a 72 h: 20 g/l, 28 g/l a 36 g/l v škále 10 l s kontinuálnym prísunom glukózového roztoku.

Pomocou ďalšej optimalizácie média použitím kmeňa PA824 v glukózovo obmedzenej fermentácii v médiu obsahujúcom 10 g/l Difco Yeast Extract, 10 g/l NZ amínu A (Quest International GmbH, Erfstadt), 10 g/l glutamátu sodného, 4 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1 ml/l vyššie opísaného roztoku stopových solí sa získali koncentrácie kyseliny pantoténovej 37 g/l (48 g/l) vo fermentačných zmesiach za 36 h (48 h) v škále 10 l s kontinuálnym prísunom glukózového roztoku.

Ďalšie zvýšenia koncentrácie kyseliny pantoténovej vo fermentačnej zmesi možno dosiahnuť ďalšou optimalizáciou média, zvýšením fermentačného času, vylepšením postupu a kmeňa a kombináciou jednotlivých krokov. Vyššie uvedené koncentrácie kyseliny pantoténovej možno dosiahnuť aj fermentáciou kmeňov, ktoré sú derivátmi vyššie uvedeného PA824. Deriváty možno pripraviť klasickým vývojom kmeňov a ďalšími manipuláciami genetického inžinieringu. Vývojom média, kmeňa a fermentačného procesu možno zvýšiť titre kyseliny pantoténovej vo fermentačných zmesiach na viac ako 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l.

Podstatnou výhodou postupu podľa vynálezu je, že fermentácia sa uskutočňuje v kultivačnom médiu, ktoré okrem aspoň jedného zdroja uhlíka a zdroja dusíka neobsahuje ako východiskové zlúčeniny žiadne iné prekursory. To znamená, že biosyntéza kyseliny D-pantoténovej je nezávislá od prísunu iných prekursorov. Na účely predloženého vynálezu sú takými prekursormi látky ako β -alanín a/alebo L-aspartát a/alebo L-valín a/alebo α -ketoizovalerát a/alebo ich kombinácie.

Vo výhodnom variante postupu podľa vynálezu sa fermentácia organizmu produkujúceho kyselinu D-pantoténovú uskutočňuje v kultivačnom médiu, ktoré obsahuje zdroj uhlíka a zdroj dusíka, ale do ktorého sa nepridáva ani nedodáva v priebehu fermentácie žiadny voľný β -alanín a/alebo soli β -alanínu. To znamená, že na produkciu kyseliny D-pantoténovej v rozmedziach aspoň 10 g/l kultivačného média, s výhodou najmenej 20 g/l, s osobitnou výhodou najmenej 40 g/l, s veľmi osobitnou výhodou najmenej 60 g/l a s najväčšou výhodou najmenej 70 g/l nie je podľa vynálezu potrebný žiadny prísun voľného β -alanínu a/alebo solí β -alanínu.

Nezávislosť od prísunu prekursorov je osobitne významnou ekonomickou výhodou postupu podľa vynálezu v porovnaní so známymi procesmi, keďže mnoho prekursorov je veľmi drahých.

Vynález však nevylučuje pridávanie β -alanínu a/alebo solí β -alanínu, takže výťažok kyseliny D-pantoténovej možno ďalej zvýšiť pridaním β -alanínu a/alebo solí β -alanínu. Ak sa napríklad predpokladá, že všetky potrebné prekursor kyseliny pantoténovej sú prítomné v dostatočnom množstve, ďalšie zvýšenie produkcie kyseliny pantoténovej limituje len aktivita génu panD, potom výťažok kyseliny pantoténovej možno zvýšiť napríklad o ďalších 50 % pridaním voľného β -alanínu a/alebo solí β -alanínu.

Vo výhodnom variante predloženého vynálezu možno do kultivačného média pridať až 20 g/l voľného β -alanínu a/alebo solí β -alanínu, aby sa výťažok kyseliny pantoténovej ďalej zvýšil o viac ako 50 %. Uprednostňuje sa pridanie približne 15 g/l voľného β -alanínu a/alebo solí β -alanínu do kultivačného média.

Príkladmi zdrojov uhlíka, ktoré sú vhodné podľa vynálezu na použitie v kultivačnom médiu na fermentáciu vyššie uvedených organizmov, sú cukry, napríklad škrobové hydrolyzáty (mono-, di-, oligosacharidy), s výhodou glukóza alebo sacharóza, a tiež repné alebo trstinové cukrové melasy, proteíny, proteínové hydrolyzáty, sójová múka, kukuričný výluh, tuky, voľné mastné kyseliny, recirkulované bunky z predchádzajúcich fermentácií alebo ich hydrolyzáty, a tiež kvasnicový extrakt. Tento zoznam neobmedzuje predložený vynález.

Okrem toho sa tento proces s výhodou vyznačuje tým, že celkový obsah cukru sa do konca fermentácie zníži na minimum, keďže inak by sa sťažilo neskoršie sušenie a/alebo formulácia fermentačného roztoku v dôsledku lepenia. Toto možno podľa vynálezu dosiahnuť pokračovaním fermentácie určitý dodatočný čas po spotrebovaní zdroja uhlíka (v prípade dávkovej kultúry) alebo po prerušení alebo regulovaní prísunu uhlíka (v prípade procesného postupu v prísunovom dávkovom alebo opakovanom prísunovom dávkovom režime) tak, že koncentrácia zdroja uhlíka bude prakticky nulová (v prípade prísunového dávkového, opakovaného dávkového alebo kontinuálneho procesného postupu).

Toto sa podľa vynálezu dosahuje tak, že po prerušení pridávania zdroja uhlíka (napríklad roztoku cukru) fermentácia pokračuje, kým sa nedosiahne koncentrácia

rozpusteného kyslíka (pO_2) vo fermentačnom roztoku najmenej 80 %, s výhodou 90 % a s osobitnou výhodou 95 % hodnoty nasýtenia.

Príkladmi zdrojov dusíka, ktoré sú vhodné podľa vynálezu, sú amoniak, síran amónny, močovina, proteíny, proteínové hydrolyzáty alebo kvasnicový extrakt. Tento zoznam neobmedzuje predložený vynález.

Okrem toho fermentačné médium obsahuje minerálne soli a/alebo stopové prvky, napríklad aminokyseliny a vitamíny. Presné zloženia vhodných fermentačných médií sú všeobecne známe a dostupné odborníkom v danej oblasti.

Po naočkovaní fermentačného média vhodným organizmom produkujúcim kyselinu D-pantoténovú (v bunkových hustotách známych odborníkom v danej oblasti), v prípade potreby s prídavkom odpeňovača, sa tento organizmus kultivuje. Akúkoľvek potrebnú reguláciu pH média možno dosiahnuť použitím rôznych anorganických alebo organických zásad alebo kyselín, napríklad NaOH, KOH, amoniaku, kyseliny fosforečnej, kyseliny sírovej, kyseliny chlorovodíkovej, kyseliny mravčej, kyseliny jantárovej, kyseliny citrónovej a podobne.

Vzhľadom na tlmivé systémy používané pri fermentácii, ktorými môžu byť, ako je opísané vyššie, napríklad NaOH, KOH, amoniak, kyselina fosforečná, kyselina sírová, kyselina chlorovodíková, kyselina mravčia, kyselina jantárová, kyselina citrónová a podobne, vytvorená kyselina D-pantoténová je prítomná vo fermentačnom roztoku v závislosti od použitého tlmivého systému vo forme príslušných solí. Keďže v tomto prípade podľa vynálezu sú najmä soli kyseliny D-pantoténovej vo forme svojich jednomocných katiónov nevýhodné a kyselina D-pantoténová vo forme svojej vápenatej alebo horečnatej soli je výhodná, fermentačný roztok sa podľa vynálezu pripravuje elektromembránovými separačnými procesmi.

Predložený vynález zahŕňa všetky dostupné typy elektromembránových separačných procesov, napríklad membránové elektrolyzy alebo elektrodialýzy. Odborník urobí vhodný výber na základe svojich skúseností.

Podľa vynálezu sa uprednostňuje použitie elektrodialýzy. Tu možno použiť nielen elektrodialýzy použitím výlučne monopolárnych membrán ale aj elektrodialýzy použitím monopolárnych a/alebo bipolárnych membrán. Osobitne výhodné sú elektrodialýzy použitím výlučne monopolárnych membrán, najmä elektrodialýzy s monopolárnymi membránami, ktoré sú selektívne pre jednomocné ióny, nazývané monoselektívne membrány.

Na uskutočnenie postupu podľa vynálezu možno použiť v podstate akékoľvek membrány bežne používané v kontexte procesov elektrodialýzy. Membránou použitou v kontexte elektrodialýzy podľa vynálezu je s výhodou komerčne konvenčná iónovymenná membrána.

Aniónovýmenné membrány, ktoré možno použiť, sú napríklad Neosepta AM1, AM2, AM3, AMX, AMH, AFN od firmy Tokuyama a AMV od firmy Asahi Glass.

Príkladmi kationovýmenných membrán sú Neosepta CM1, CM2, CMX, CMH, CMB, Asahi glass CMV a tiež Nafion 435 alebo 350 od Du Pont de Nemours.

Monoselektívnou kationovýmennou membránou, ktorú možno spomenúť, je napríklad membrána Neosepta CMS.

Monoselektívne aniónovýmenné membrány, ktoré možno použiť, sú napríklad membrány Neosepta ACS od firmy Tokuyama alebo Selmion ASV od Asahi Glass.

Použitými elektródami môže byť nehrdzavejúca oceľ, nikel, vzácne kovy, napríklad platina alebo iné vhodné materiály známe odborníkom v danej oblasti.

Použitím monopolárnej elektrodialýzy podľa vynálezu možno z roztoku obsahujúceho pantotenát preniesť nielen anióny ale aj kationy migráciou v elektrickom poli cez anióno- alebo kationovýmenné membrány do druhého roztoku (roztok koncentráty, CONC) a tým ich odstrániť z roztoku obsahujúceho kyselinu pantoténovú (roztok diluátu, DIL). Podľa vynálezu sa nízkomolekulové ióny s výhodou odstraňujú z roztoku obsahujúceho kyselinu pantoténovú. Na účely predloženého vynálezu sú nízkomolekulovými iónmi tie, ktoré sú zavedené do fermentačnej zmesi zložením

kultivačného média a/alebo tlmivého systému, ale sú nežiaduce v koncovom produkte. Ide napríklad o nasledujúce ióny: amónne, draselné, sodné, železité, chloridové, fosforečnanové alebo síranové ióny.

V ďalšom uskutočnení predloženého vynálezu je možné uskutočniť iónovú výmenu jednomocných katiónov, napríklad Na^+ alebo amónnych iónov, oproti viacmocným katiónom, napríklad Ca^{2+} . Na toto sa používajú katiónovýmienné membrány, ktoré sú selektívne pre jednomocné ióny. Takto sa napríklad do okruhu I zavedie roztok CaCl_2 a do druhého okruhu II oddeleného od okruhu I katiónovýmiennou membránou sa zavedie roztok kyseliny pantoténovej obsahujúci jednomocný katión. Potom cez katiónovýmiennú membránu, ktorá je selektívna pre jednomocné ióny a nachádza sa medzi komorou II a komorou III, sa jednomocné katióny s výhodou prenesú do tretej komory III. Súčasne anióny, napríklad chloridové ióny, sa prenesú z komory I do komory III cez aniónovýmiennú membránu nachádzajúcu sa medzi komorou I a komorou III. Ióny Ca^{2+} sa prenesú z komory I do komory II cez katiónovýmiennú membránu. Takýmto spôsobom sa získa priamo D-pantotenát vápenatý. Keď je prítomná soľ slabej kyseliny, napríklad kyseliny pantoténovej, môže sa v takomto usporiadaní produkovať aj voľná kyselina D-pantoténová, ak sa do komory I zavedie namiesto CaCl_2 vodný roztok HCl .

Vynález zahŕňa aj použitie vápenatých solí a/alebo horečnatých solí vo forme anorganických alebo organických aniónov. Podľa vynálezu sa s výhodou použijú chlorid, dusičnan, hydroxid, mravčan, octan, propionát, glycinát alebo laktát vápenatý a/alebo horečnatý.

V alternatívnom uskutočnení predloženého vynálezu, keď sa používa bipolárna elektrodialýza, možno katióny s výhodou preniesť do druhého roztoku z roztoku obsahujúceho pantotenát cez katiónovýmienné membrány a tak odstrániť z roztoku obsahujúceho kyselinu pantoténovú so súčasným prisunom protónov disociáciou vody v bipolárnej membráne. V druhom roztoku sa tvoria zodpovedajúce bázy katiónov, ktoré boli prenesené, pomocou hydroxidových iónov získaných disociáciou vody v bipolárnej membráne.

V ďalšom uskutočnení predloženého vynálezu, keď sa používa bipolárna elektrodialýza, možno anióny s výhodou preniesť do druhého roztoku z roztoku obsahujúceho pantotenát cez aniónovýmennú membránu a tak odstrániť z roztoku obsahujúceho kyselinu pantoténovú so súčasným prísunom hydroxidových iónov disociáciou vody v bipolárnej membráne. V druhom roztoku sa tvoria zodpovedajúce kyseliny aniónov, ktoré boli prenesené, pomocou protónov získaných disociáciou vody v bipolárnej membráne.

Vynález zahŕňa aj ďalšie alternatívne uskutočnenie, v ktorom sa použitím bipolárnej elektrodialýzy najprv s výhodou anióny prenesú z roztoku obsahujúceho pantotenát do druhého roztoku cez aniónovýmenné membrány a tak sa odstraňuje z roztoku obsahujúceho kyselinu pantoténovú so súčasným prísunom hydroxidových iónov disociáciou vody v bipolárnej membráne, a kationy sa prenášajú z roztoku obsahujúceho pantotenát do tretieho roztoku cez kationovýmenné membrány a tak sa odstraňujú z roztoku obsahujúceho kyselinu pantoténovú so súčasným prísunom protónov disociáciou vody v bipolárnej membráne. V druhom roztoku sa tvoria zodpovedajúce kyseliny prenesených aniónov pomocou protónov získaných disociáciou vody v bipolárnej membráne a v treťom roztoku sa tvoria zodpovedajúce bázy prenesených kationov pomocou hydroxidových iónov získaných disociáciou vody v bipolárnej membráne.

Podľa vynálezu s výhodou v tomto procese sa navyše pH roztoku obsahujúceho pantotenát nastavuje na izoelektrický bod kyseliny pantoténovej použitím kyselín alebo báz. Vďaka tomu možno výťažok voľnej kyseliny D-pantoténovej ďalej zvýšiť alebo stratu možno ďalej minimalizovať.

Monopolárna elektrodialýza je osobitne výhodný variant, keďže je vysoko nákladovo efektívna v porovnaní s bipolárnou elektrodialýzou.

Bipolárnu elektrodialýzu možno použiť najmä vtedy, keď sa nemajú pridávať kyseliny alebo bázy na úpravu pH, alebo keď možno existujúci roztok kyseliny alebo hydroxidu alkalického kovu ďalej použiť.

Varianty elektrodialýzy podľa vynálezu ponúkajú výhodu, že nevznikajú žiadne odpadové vody pri regenerácii iónovýmienných živíc.

Použitie elektroseparačných procesov podľa vynálezu s výhodou odstraňuje nežiaduce nízkomolekulové ióny (cudzie ióny) ako amónne, draselné, sodné, železité, chloridové, fosforečnanové alebo síranové ióny z roztoku obsahujúceho D-pantotenát. To znamená, že sa s výhodou tvorí voľná kyselina D-pantoténová alebo jej požadované soli, napríklad D-pantotenát vápenatý a/alebo horečnatý.

Podľa vynálezu je obsah jednomocných katiónov, s výhodou amónnych, draselných a/alebo sodných iónov, znížený na koncentráciu ≤ 1 g/kg roztoku.

Obsah nežiaducich aniónov, napríklad chloridových, síranových alebo fosforečnanových iónov, možno tiež výrazne znížiť voľbou iónovýmiennej membrány, s výhodou použitím aniónovýmiennej membrány.

Výsledný roztok obsahujúci voľnú kyselinu D-pantoténovú je podľa vynálezu nastavený na pH 3 – 10 pridaním vápenatej bázy a/alebo horečnatej bázy. Výhodné je pH 5 – 10. pH sa s výhodou nastaví na hodnotu 5 – 9, s osobitnou výhodou 6 – 9 a s veľmi osobitnou výhodou 6 – 8. Takto sa získa roztok obsahujúci pantotenát vápenatý a/alebo pantotenát horečnatý. Pri neutralizácii sa do roztoku s výhodou pridáva hydroxid vápenatý, uhličitan vápenatý, oxid vápenatý, hydroxid horečnatý a/alebo bázičný uhličitan horečnatý vo forme tuhej látky a/alebo ako vodná suspenzia.

V tomto prípade je podľa vynálezu výhodné, ak sa roztok obsahujúci voľnú kyselinu D-pantoténovú neutralizuje vápenatou bázou a/alebo horečnatou bázou vo forme vodnej suspenzie. V dôsledku použitia vodnej disperzie sa neutralizácia uskutočňuje rýchlejšie a bez relatívne veľkých fluktuácií pH v porovnaní s prípadom, keď sa použije zodpovedajúca tuhá látka.

Podľa vynálezu sa postup vyznačuje tým, že do roztoku sa v kroku c) pridá vodná suspenzia obsahujúca 2 – 55 % hmotnostných, s výhodou 10 – 50 % hmotnostných a s osobitnou výhodou 20 – 40 % hmotnostných hydroxidu vápenatého. Vynález okrem toho zahŕňa postup, pri ktorom sa do roztoku v kroku c) pridá vodná

suspensia obsahujúca 2 – 65 % hmotnostných, s výhodou 10 – 50 % hmotnostných a s osobitnou výhodou 20 – 40 % hmotnostných uhličitanu vápenatého. V ďalšom uskutočnení predloženého vynálezu sa do roztoku v kroku c) postupu podľa vynálezu pridá vodná suspenzia obsahujúca 2 – 60 % hmotnostných, s výhodou 10 – 50 % hmotnostných a s osobitnou výhodou 20 – 40 % hmotnostných hydroxidu horečnatého. Vynález zahŕňa aj postup, pri ktorom sa do roztoku v kroku c) pridá vodná suspenzia obsahujúca 2 – 25 % hmotnostných, s výhodou 10 – 20 % hmotnostných bázičného uhličitanu horečnatého.

Fermentačný roztok sa vysuší a/alebo formuluje pomocou všeobecne známych postupov, napríklad sušením rozprašovaním, granuláciou rozprašovaním, sušením vo fluidnej vrstve, granuláciou vo fluidnej vrstve, bubnovým sušením alebo spin-flash sušením (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6. vydanie, 1999, elektronická verzia, kapitola „Drying of Solid Materials“). Vstupná teplota plynu v konvekčnom sušení je v rozmedzí 100 – 280 °C, s výhodou 120 – 210 °C. Výstupná teplota plynu je 50 – 180 °C, s výhodou 60 – 150 °C. Aby sa dosiahla požadovaná distribúcia veľkosti častíc a súvisiace vlastnosti produktu, jemné častice možno oddeľovať a recirkulovať. Okrem toho hrubý materiál možno mlieť v mlyne a rovnako potom recirkulovať.

Podľa vynálezu je zníženie počtu zložitých spracovacích krokov výhodné, najmä vyhnutie sa používaniu organických rozpúšťadiel so súbežnou výrobou požadovaného produktu s vysokou biologickou hodnotou. Okrem toho sa podľa vynálezu významne znižuje množstvo produkovanej odpadovej vody. To vedie k ďalším úsporám v zložitých zariadeniach na spracovanie a manipuláciu. Postup podľa vynálezu sa teda s výhodou vyznačuje tým, že je jednoduchší, menej citlivý na chyby, menej časovo náročný, výrazne menej drahý a teda hospodárnejší ako konvenčné procesy.

To však nevylučuje, aby sa postup podľa vynálezu mohol meniť. Kroky postupu podľa vynálezu a) až d) spomenuté na začiatku možno doplniť jedným alebo viacerými z nasledujúcich procesných krokov, ktoré sú samy osebe známe odborníkom v danej oblasti. V tomto prípade sú všetky predstaviteľné kombinácie dodatočných

(prevádzkových) procesných krokov so (základnými) procesnými krokmi a) až d) pokryté vynálezom.

Roztoky pochádzajúce z procesných krokov a) – c) možno dezinfikovať, napríklad zahriatím (sterilizáciou) alebo inými metódami, napríklad pasterizáciou alebo sterilnou filtráciou.

V ďalších variantoch postupu podľa vynálezu pred vysušením a/alebo formuláciou roztoku možno uskutočniť aspoň jeden krok a/alebo kombinácie z nasledujúcich krokov: lýza a/alebo sterilizovanie biomasy a/alebo oddelenie biomasy od fermentačného roztoku a/alebo prídanie ďalších prísad a/alebo nakoncentrovanie fermentačného roztoku, s výhodou odstránením vody.

Predložený vynález sa teda týka aj postupu, pri ktorom sa lýza a/alebo sterilizácia biomasy uskutoční ešte vo fermentačnom roztoku alebo nie až po odseparovaní biomasy od fermentačného roztoku. Toto možno uskutočniť napríklad tepelným spracovaním, s výhodou pri 80 – 200 °C a/alebo spracovaním kyselinou, s výhodou kyselinou sírovou alebo kyselinou chlorovodíkovou, a/alebo enzymaticky, s výhodou lyzozýmom.

V ďalšom uskutočnení predloženého vynálezu možno bunky fermentovaných mikroorganizmov odstrániť filtráciou, separáciou (napríklad centrifugovaním) a/alebo dekantáciou z roztokov krokov a), b) alebo c) postupu podľa vynálezu. Je tiež možné, aby roztoky z krokov a), b) alebo c) bez separácie prítomných organizmov prechádzali priamo cez jednu alebo viacero iónoselektívnych membrán aplikovaním elektrického poľa.

Roztok získaný spracovaním membránovou elektrolýzou alebo elektrodialýzou možno po neutralizácii nakoncentrovať pomocou vhodnej odparky, napríklad odparky s klesajúcim filmom, odparky s tenkým filmom alebo rotačnej odparky. Také odparky vyrábajú napríklad firmy GIG (4800 Attnang Puchheim, Rakúsko), GEA Canzier (52303 Düren, Nemecko), Diessel (31103 Hildesheim, Nemecko) a Pitton (35274 Kirchhain, Nemecko).

Na zlepšenie farebných vlastností koncového produktu možno uskutočniť dodatočný krok filtrácie, pri ktorom sa do roztokov získaných počas postupu pridá troška aktívneho uhlia a táto suspenzia sa potom prefiltruje. Alternatívne možno roztoky získané počas fermentácie prefiltrovať cez malú vrstvu aktívneho uhlia. Použité množstvá aktívneho uhlia, ktoré sú na to potrebné, sú v rozmedzí niekoľkých hmotnostných percent roztoku a dokáže ich určiť odborník v danej oblasti na základe vedomostí a skúseností.

Tieto filtrácie možno zjednodušiť pridaním komerčného flokulačného činidla do príslušného roztoku pred filtráciou (napríklad Sedipur CF 902 alebo Sedipur CL 930 od BASF AG, Ludwigshafen).

Vo výhodnom uskutočnení predloženého vynálezu sa fermentačný výstup (fermentačná zmes) sterilizuje zahrievaním a potom sa oddelí od bunkovej masy centrifugovaním, filtráciou alebo dekantáciou. Po pridaní 50 – 1000 mg/kg, s výhodou 100 – 200 mg/kg komerčne konvenčného flokulačného činidla vzhľadom na fermentačný výstup sa zmes prefiltruje cez malú vrstvu aktívneho uhlia a piesku, aby sa získal roztok bez biomasy s vysokým obsahom kyseliny D-pantoténovej. Tento spracovaný roztok sa potom nechá prejsť cez jednu alebo viacero iónovo selektívnych membrán aplikovaním elektrického poľa.

Tento roztok možno potom vysušiť, napríklad sušením rozprašovaním. Toto možno uskutočniť v súbežnom, protiprúdovom alebo zmiešanom toku. Na atomizáciu možno použiť všetky známe atomizátory, najmä centrifugálne atomizátory (atomizátorový disk), jednotekutinovú hubicu alebo dvojtekutinovú hubicu. Výhodné teplotné podmienky pri sušení sú 150 – 250 °C vstupná teplota veže a 70 – 130 °C výstupná teplota veže. Sušenie však možno uskutočniť aj pri vyšších alebo nižších teplotách. Aby sa dosiahla veľmi nízka zvyšková vlhkosť, v rámci ďalších krokov možno poskytnúť ďalší krok sušenia vo fluidnej vrstve.

Sušenie rozprašovaním možno uskutočniť aj v FSD alebo SBD sušičke (FSD: fluidized spray dryer; SBD: spray bed dryer), ktoré vyrábajú firmy Niro (Kodaň,

Dánsko) a APV-Anhydro (Kodaň, Dánsko), ktoré sú kombináciou rozprašovacej sušičky a fluidnej sušičky.

Pri sušení rozprašovaním možno pridať prostriedok proti spekaniu. Toto môže znížiť nanášanie materiálu na steny sušičky a zlepšiť správanie toku najmä v prípade jemnozrnných práškov. Prostriedky proti spekaniu, ktoré možno použiť, sú najmä silikáty, stearáty, fosfáty a kukuričný škrob.

Sušenie môže v zásade prebiehať aj v rozprašovanej fluidnej vrstve, kedy sušenie možno uskutočňovať nielen kontinuálne ale aj dávkovo. Roztok možno rozprašovať nielen zhora (horné rozprašovanie) a zospodu (dolné rozprašovanie), ale aj zboku (bočné rozprašovanie).

Predložený vynález sa ďalej týka kompozície na použitie ako krmivovej prísady a/alebo krmivového doplnku, kedy túto možno pripraviť nasledujúcimi krokmi:

a) použitie aspoň jedného organizmu, ktorý produkuje kyselinu D-pantoténovú a v ktorom je biosyntéza kyseliny pantoténovej (pan) a/alebo izoleucínu/valínu (ilv) deregulovaná a ktorý tvorí aspoň 2 g/l solí kyseliny D-pantoténovej fermentáciou v kultivačnom médiu, pričom sa do kultivačného média dodáva 0 – 20 g/l, s výhodou 0 g/l voľného β -alanínu a/alebo soli β -alanínu,

b) prechod fermentačného roztoku obsahujúceho D-pantotenát cez jednu alebo viacero iónovo selektívnych membrán aplikovaním elektrického poľa, pričom sa z roztoku obsahujúceho D-pantotenát odstraňujú nízkomolekulové ióny,

c) prídanie vápenatej bázy a/alebo horečnatej bázy, aby sa voľná kyselina D-pantoténová obsiahnutá v roztoku upravila na pH 3 – 10, pričom sa získa roztok, ktorý obsahuje pantotenát vápenatý a/alebo horečnatý, a

d) podrobenie roztoku obsahujúceho pantotenát vápenatý a/alebo pantotenát horečnatý sušeniu a/alebo formulácii.

Vo variante predloženého vynálezu sa kompozícia vyznačuje tým, že v kroku c) alebo d) sa získava alebo nanáša suspenzia, ktorá obsahuje pantotenát vápenatý a/alebo pantotenát horečnatý.

Podľa vynálezu sa kompozícia ďalej vyznačuje tým, že obsahuje soli kyseliny D-pantoténovej v koncentrácii najmenej 1 – 100 % hmotnostných, s výhodou najmenej 20 – 100 % hmotnostných a s osobitnou výhodou najmenej 50 % hmotnostných. Predložený vynález sa týka kompozície, ktorá obsahuje soli kyseliny D-pantoténovej vo forme dvojmocných katiónov, s výhodou D-pantotenát vápenatý a/alebo horečnatý. Podľa vynálezu je výhodná kompozícia, ktorá sa vyznačuje tým, že obsah solí kyseliny D-pantoténovej vo forme jednomocných katiónov je ≤ 1 g/kg.

Podľa vynálezu sa pomocou vyššie opísaného postupu získa D-pantotenát vápenatý alebo D-pantotenát horečnatý, ktorý vyhovuje požiadavkám na krmivové prísady. Tieto požiadavky sú napríklad pomerne vysoký obsah D-pantotenátu a vysoká kompatibilita s cieľovým organizmom a biologická hodnota v zmysle „vitamínovej aktivity“ produktu podľa vynálezu.

Predložený vynález bude teraz opísaný podrobnejšie na nasledujúcich príkladoch, ktoré však neobmedzujú rozsah vynálezu:

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1:

Do laboratórneho fermentora obsahujúcom miešadlo a zariadenie na privod plynu s objemom 14 l sa dalo fermentačné médium s nasledujúcim zložením:

Východisková látka	Koncentrácia [g/l]
Kvasnicový extrakt	10
Glutamát sodný	5
Síran amónny	8

Východisková látka	Koncentrácia [g/l]
Odpeňovač	1 ml/l

Po sterilizácii sa pridali nasledujúce sterilné zložky média:

Východisková látka	Koncentrácia [g/l]
KH_2PO_4	10
K_2HPO_4	20
Glukóza	2,5
Chlorid vápenatý	0,1
Chlorid horečnatý	1
Citrát sodný	0,1
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
Roztok stopových solí	1 ml/l

Roztok stopových solí má nasledujúce zloženie:

0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g H_3BO_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 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sa doplní do 1 l vodou. Roztok stopových solí sa pridá sterilnou filtráciou. Počiatočný objem kvapaliny je 8,4 l. Vyššie uvedené obsahy sú založené na tejto hodnote.

Do tohto roztoku sa pridá 160 ml očkovacej kultúry ($\text{OD} = 10$ v médiu SVY (médiu SVY: Difco Veal Infusion Broth 25 g, Difco Yeast Extract 5 g, glutamát sodný 5 g, 2,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v 740 ml H_2O , sterilizovať; pridať 200 ml sterilného 1M K_2HPO_4 (pH 7) a 60 ml sterilného 50 % glukózového roztoku (konečný objem 1l)) *Bacillus subtilis* PA824 a fermentuje sa pri 43 °C pri intenzívnom miešaní s prietokom plynu 12 l/min. Tento kmeň je opísaný v súlade s prílohou v prihláške PCT/US 0025993.

V priebehu 52 h sa pridalo 6 l sterilného vodného roztoku. Zloženie bolo:

Východisková látka	Koncentrácia [g/l]
Glukóza	500
Chlorid vápenatý	0,6
Roztok stopových solí	7 ml/l

Fermentácia sa uskutočňovala za glukózovo obmedzených podmienok. V priebehu fermentácie sa pH udržiavalo na hodnote 7,2 pridávaním 25 % roztoku amoniaku alebo 20 % kyseliny fosforečnej. Amoniak slúži súčasne ako zdroj dusíka pre fermentáciu. Rýchlosť rotácie miešacieho prvku sa regulovala tak, aby sa obsah rozpusteného kyslíka udržiaval na 30 % hodnoty nasýtenia. Penenie sa potláčalo príležitostným pridávaním odpeňovača. Po zastavení pridávania zdroja uhlíka fermentácia pokračovala, kým obsah rozpusteného kyslíka (pO_2) nedosiahol hodnotu 95 % hodnoty nasýtenia. Fermentácia sa potom zastavila a organizmus sa termálne zničil. V rámci toho sa fermentačný roztok sterilizoval 60 min. Zničenie sa preukázalo kultiváciou. Bunky sa potom oddelili centrifugovaním. Po oddelení buniek je koncentrácia D-pantotenátu po 52 h 24,7 g/l.

Podobne možno pripraviť fermentačné zmesi, ktoré majú titre kyseliny pantoténovej bez prísunu β -alanínu vyššie ako 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l.

Fermentačný výstup, ktorý bol sterilizovaný zahrievaním, ako je opísané vyššie, a bol v podstate zbavený biomasy centrifugovaním, sa zmiešal s ďalšou kyselinou D-pantoténovou a pH sa potom upravilo na približne 2 pomocou kyseliny sírovej. Získaný roztok sa prefiltroval cez malú vrstvu piesku s aktívnym uhlím. Obsah kyseliny D-pantoténovej v tomto roztoku je 67,7 g/l.

900 g tohto filtrátu sa spracovalo elektrodialýzou nasledovne: v elektrodialyzačnej bunke (vybavenej anióno- a kationovýmennými membránami (typy

Neosepta AMX Sb a CMX Sb, od firmy Tokuyama) s účinnou bunkovou plochou $1,85 \text{ dm}^2$ a piatimi komorami sa filtrát odsolil pri počiatkovej prúdovej hustote 29 mA/cm^2 . Prúdová hustota v experimentálnom behu po dosiahnutí určeného limitného napätia 20 V kontinuálne klesala. Teplota bola od 33°C do 40°C . Ako nástrek koncentrátu sa použil 0,5 % (hmotnosť/hmotnosť) roztok NaCl. Tento koncentrát (CONC) sa v experimentálnom behu obohatil cudzími iónmi (napr. amónnymi, chloridovými, železitými, draselnými, sodnými alebo fosforečnanovými iónmi) odstránenými z filtrátu (diluát, DIL). V elektrolytovom cykle sa na oplachovanie elektród použil 5 % (hmotnosť/hmotnosť) roztok síranu sodného. V experimentálnom behu sa pri rôznych hodnotách iónovej vodivosti roztoku diluátu odoberali vzorky z komory obsahujúcej diluát a analyzovali sa. Analýza je uvedená v nasledujúcej tabuľke a ukázala, že s postupujúcim časom experimentu boli tieto ióny odstránené z diluátu a vodivosť diluátu klesala zodpovedajúcim spôsobom. Malé jednomocné ióny, napríklad chloridové ióny, sa odstraňujú rýchlejšie ako objemné viacmocné ióny, napríklad fosforečnanové ióny.

Výsledky analýzy diluátu sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

	PTA g/l	Ióny (laboratórna analýza U)								
		Amónium	Cl	o-Fosfát	Ca	Fe	K	Mg	Na	
Východisková látka (mS/cm)	67,7	0,35-0,40%	0,90-0,97%	0,61-0,79%	0,009%	<0,001%	0,45%	0,002%	-	
4831/00/196 DIL 25 mS/cm	67,9	0,22%	0,65%	0,56%	0,005%	<0,001%	0,30%	0,002%	0,089%	
4831/00/196 DIL 20 mS/cm	70,7	0,16%	0,49%	0,53%	0,004%	<0,001%	0,23%	0,002%	0,077%	
4831/00/196 DIL 15 mS/cm	64,1	0,12%	0,32%	0,54%	0,003%	<0,001%	0,16%	0,001%	0,063%	
4831/00/196 DIL 10 mS/cm	73,2	0,08%	0,16%	0,48%	0,002%	<0,001%	0,099%	0,001%	0,047%	
4831/00/196 DIL 5 mS/cm	79,9	0,03%	0,04%	0,35%	0,001%	<0,001%	0,038%	0,001%	0,025%	
4831/00/196 DIL 3 mS/cm	75,6	0,02%	0,01%	0,26%	0,001%	<0,001%	0,016%	<0,001%	0,015%	
4831/00/196 DIL-koniec	76,0	0,01%	<0,01%	0,21%	<0,001%	<0,001%	0,009%	<0,001%	0,010%	

PTA = kyselina pantoténová

pH všetkých vzoriek diluátu bolo 2 – 3. 771 g výtoku diluátu obsahuje 76 g/l voľnej kyseliny D-pantoténovej.

Tu je ukázané, že roztok kyseliny D-pantoténovej získaný fermentáciou možno úspešne zbaviť interferujúcich kationov elektrolyzou. Zo získanej odsolenej kyseliny D-pantoténovej možno pripraviť nehygroscopický práškový D-pantotenát vápenatý, ako je opísané v príklade 2.

Príklad 2:

Do laboratórneho fermentora obsahujúcom miešadlo a zariadenie na prívod plynu s objemom 14 l sa dalo fermentačné médium s nasledujúcim zložením:

Východisková látka	Koncentrácia [g/l]
Kvasnicový extrakt	10
Glutamát sodný	5
Síran amónny	8
KH_2PO_4	8,4
K_2HPO_4	15

Po sterilizácii sa pridali nasledujúce sterilné zložky média:

Východisková látka	Koncentrácia [g/l]
Glukóza	2,5
Chlorid vápenatý	0,1
Chlorid horečnatý	1
Citrát sodný	1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
Roztok stopových solí	1 ml

Roztok stopových solí má nasledujúce zloženie:

0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g H_3BO_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 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sa doplní do 1 l vodou. Roztok stopových solí sa pridá sterilnou filtráciou. Počiatočný objem kvapaliny je 5,5 l. Vyššie uvedené obsahy sú založené na tejto hodnote.

Do tohto roztoku sa pridá 55 ml očkovacej kultúry ($\text{OD} = 10$ v médiu SVY (médiu SVY: Difco Veal Infusion Broth 25 g, Difco Yeast Extract 5 g, glutamát sodný 5 g, rozpustiť 2,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v 740 ml H_2O , sterilizovať; pridať 200 ml sterilného 1M K_2HPO_4 (pH 7) a 60 ml sterilného 50 % glukózového roztoku (konečný objem 1l)) *Bacillus subtilis* PA824 a fermentuje sa pri 43 °C pri intenzívnom miešaním s prietokom plynu 12 l/min. Tento kmeň je opísaný v súlade s prílohou v prihláške PCT/US 0025993.

V priebehu 48 h sa pridalo 6 l sterilného vodného roztoku. Zloženie bolo:

Východisková látka	Koncentrácia [g/l]
Glukóza	550
Chlorid vápenatý	0,6
Roztok stopových solí	6 ml

Fermentácia sa uskutočňovala za glukózovo obmedzených podmienok. V priebehu fermentácie sa pH udržiavalo na hodnote 7,2 pridávaním 25 % roztoku amoniaku alebo 20 % kyseliny fosforečnej. Amoniak slúži súčasne ako zdroj dusíka pre fermentáciu. Rýchlosť rotácie miešacieho prvku sa regulovala tak, aby sa obsah rozpusteného kyslíka udržiaval na 30 % hodnoty nasýtenia. Penenie sa potláčalo príležitostným pridávaním odpeňovača. Po zastavení pridávania zdroja uhlíka fermentácia pokračovala, kým obsah rozpusteného kyslíka (pO_2) nedosiahol hodnotu 95 % hodnoty nasýtenia. Fermentácia sa potom zastavila a organizmus sa termálne zničil. V rámci toho sa fermentačný roztok sterilizoval 30 min. Zničené sa preukázalo kultiváciou. Bunky sa oddelili centrifugovaním. Po oddelení buniek bola koncentrácia D-pantotenátu po 48 h 24,1 g/l.

Podobne možno pripraviť fermentačné zmesi, ktoré majú titre kyseliny pantoténovej bez prísunu β -alanínu vyššie ako 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l.

2 817 ml výstupu z fermentora sa zmiešalo s 1 183 ml roztoku kyseliny pantoténovej s koncentráciou 178,9 g/l a neutralizovalo sa 25 % roztoku hydroxidu amónneho (pH 6,5). Zmes sa potom prefiltrovala cez piesok s aktívnym uhlím. Obsah kyseliny D-pantoténovej vo filtráte bol 67 g/l, prevažne vo forme amónnej soli.

Približne 720 g tohto roztoku sa spracovalo elektrodialýzou podľa príkladu 1:

550 g výtoku diluátu (s hustotou 1,017 g/ml) sa upravilo na pH 7,5 pomocou 3,5 g 40 % suspenzie hydroxidu vápenatého. Získal sa vodný roztok D-pantotenátu vápenatého (551,03 g s obsahom D-pantotenátu vápenatého 40,9 g/l).

Vodný roztok pantotenátu vápenatého sa vysušil v laboratórnej rozprašovacej sušičke Niro Minor. Vstupná teplota veže bola približne 200 °C a výstupná teplota veže bola 90 °C. Atomizácia sa uskutočnila pomocou dvojtekutinovej hubice pri tlaku 2 bar. Ako práškový prostriedok sa pridal Sipernat 22F. Získal sa práškový produkt nasledujúcej špecifikácie (čísla v hmotnostných percentách):

Obsah vody: 2,3 %

D-pantotenát vápenatý: 46,1 %

Amoniak: 0,60 %

Draslík: 0,47 %

Sodík: 1,1 %

Príklad 3:

Vo fermentore obsahujúcom miešadlo a zariadenie na privod plynu s kapacitou 200 litrov sa zmiešalo 800 g 50 % kvasnicového extraktu, 438 g glutamátu sodného, 3200 g sójovej múky, 640 g síranu amónneho, 800 g KH_2PO_4 , 1 600 g K_2HPO_4 a 50 ml odpeňovača TegoKS so 70 l vody a zmes sa sterilizovala 30 min pri 121 °C.

Potom sa pridal roztok 1 a roztok 2.

Roztok 1 bol pripravený nasledovne: 1670 g glukózy $\cdot$ H_2O , 10,2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 170,7 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sa rozpustia v 9 l vody a sterilizujú sa 30 min.

Roztok 2 sa pripraví nasledovne: 800 ml citrátovo-železnatého roztoku (200 g/l citrátu sodného, 2 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, sterilne prefiltrovaný) sa zmieša s 80 ml roztoku stopových solí (0,15 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 2,5 g H_3BO_3 , 0,7 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,25 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,6 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,3 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ sa doplnia do 1 l vodou a sterilne sa prefiltrujú).

Do tohto roztoku sa pridali 2 l očkovacej kultúry ($OD = 10$ v médiu SVY (médiu SVY: Difco Veal Infusion Broth 25 g, Difco Yeast Extract 5 g, glutamát sodný 5 g, 2,7 g $(NH_4)_2SO_4$ v 740 ml H_2O , sterilizovať; pridať 200 ml sterilného 1M K_2HPO_4 (pH 7) a 60 ml sterilného 50 % glukózového roztoku (konečný objem 1l)) *Bacillus subtilis* PA668 a fermentoval sa pri 43 °C pri intenzívnom miešaní s prietokom plynu 3 m³/min. Tento kmeň je opísaný v súlade s prílohou v prihláške US č. 60/262,995.

V priebehu 48 h sa pridalo približne 10 l sterilného vodného roztoku glukózy. Roztok bol pripravený nasledovne: 90 kg glukózy $\cdot$ H_2O sa zmiešalo s 55 kg vody a sterilizovalo sa 30 min. Potom sa pridalo 300 ml roztoku stopových solí (zloženie pozrite vyššie) a 3 l citrátovo-železnatého roztoku (zloženie pozrite vyššie). Potom sa pridal 1 l sterilne filtrovaného roztoku 90 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 2 l sterilne filtrovaného roztoku 375 g/l glutamátu sodného.

Fermentácia sa uskutočňovala za glukózovo obmedzených podmienok. V priebehu fermentácie sa pH udržiavalo na hodnote 7,2 pridávaním 25 % roztoku amoniaku alebo 20 % kyseliny fosforečnej. Amoniak slúži súčasne ako zdroj dusíka pre fermentáciu. Rýchlosť rotácie miešacieho prvku sa regulovala tak, aby sa obsah rozpusteného kyslíka udržiaval na 30 % hodnoty nasýtenia. Penenie sa potláčalo príležitostným pridávaním odpeňovača. Po zastavení pridávania zdroja uhlíka fermentácia pokračovala, kým obsah rozpusteného kyslíka (pO_2) nedosiahol hodnotu 95 % hodnoty nasýtenia. Fermentácia sa potom ukončila. Bunky sa oddelili separáciou na diskovom separátore. Bunky ostávajúce v supernatante sa termálne zničili sterilizáciou. Koncentrácia D-pantotenátu pri zastavení po 48 h bola 13,7 g/l. Po separácii a sterilizácii bola koncentrácia D-pantotenátu 10,7 g/l. Podobne možno pripraviť fermentačné zmesi, ktoré majú titre kyseliny pantoténovej bez

prísunu β -alanínu vyššie ako 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a vyššie ako 90 g/l. 3 000 g takto predbežne spracovaného fermentačného roztoku bolo ďalej spracovaných nasledovne: dve tretiny dávky sa vyzrážali pri približne 10 °C množstvom CaCl_2 zodpovedajúcim ekvivalentu koncentrácie viacmocných aniónov (40 % roztok); jedna tretina dávky sa podobne vyzrážala ekvivalentným množstvom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (tuhým). Roztoky sa uskladnili cez noc v chladničke a potom sa oddelili od vyzrážaného sedimentu pomocou tlakového filtra (hlbkový filter Seitz 700). Roztoky sa potom zmiešali a zalkalizovali ($\text{pH} = 8,7$) pridaním ďalších 10 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pri približne 10 °C a vyzrážali sa znova. Aj opakovane vyzrážaný sediment sa odfiltroval.

1 800 g roztoku sa potom podrobilo iónovej výmene pri 35 °C v trojokruhovom elektrodialyzačnom systéme. V tomto prípade fermentačný roztok prechádzal cez produktovú komoru ohraničenú dvoma kationovýmennými membránami. Na katódovej strane monoselektívna kationovýmenná membrána (Tokuyama Soda, CMS) oddeľovala produkt od okruhu koncentráту a na anódovej strane bola produktová komora oddelená od okruhu CaCl_2 konvenčnou kationovýmennou membránou (Tokuyama Soda, CMX). Okruh koncentráту a CaCl_2 boli oddelené aniónovýmennou membránou (Tokuyama Soda, AMX). Do koncentráту sa dalo 750 g 0,5 % roztoku NaCl a do okruhu CaCl_2 sa dalo 900 g 3,05 % roztoku CaCl_2 . V okruhu oplachu elektród cirkuloval 0,1 molárny roztok Na_2SO_4 . Experiment sa uskutočnil galvanostaticky pri 30 mA/cm² v systéme pozostávajúcom z piatich zo základných jednotiek opísaných vyššie s celkovou plochou membrán 500 cm² v dávkovom režime. Kritériom zvoleným na zastavenie bola minimálna vodivosť 4 mS/cm v okruhu CaCl_2 . Výsledky analýzy kationov v okruhu produktu a koncentráту sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

	PTA [g/l]	Ca^{2+}	Na^+	K^+	NH_4^+
5329/01/82 Produkt t = 0	9,27	0,24%	0,15%	0,65%	0,24%
5329/01/82 Produkt t = 0,83 h	9,01	0,43%	0,07%	0,25%	0,06%
5329/01/82 Koncentrát t = 0 h	0,0	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%

	PTA [g/l]	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺
5329/01/82 Koncentrát t = 0,83 h	0,015	0,02%	0,47%	0,71%	0,29%

Z tohto sa vypočítajú ochudobnenia 51 % pre sodík, 66 % pre amoniak a 61 % pre draslík. Stredný aktuálny výťažok bol 82 %. Strata kyseliny pantoténovej v dvoch susedných okruhoch bola v každom prípade 0,08 % z množstva použitej látky. pH produktového okruhu bolo počas experimentu 7 – 7,5 a v okruhu koncentráту a CaCl₂ bolo približne pH = 6. Celkový potenciálový rozdiel stúpala v priebehu experimentu v súlade s klesajúcou vodivosťou v okruhu CaCl₂ z približne 11 na 16 V.

Takto elektrodialyticky spracovaný roztok sa potom úspešne vysušil rozprašovaním, čím sa získal koncový produkt. Je tu ukázané, že v prípade vhodného predbežného spracovania možno použiť trojokruhovú dialýzu s použitím monoselektívnej kationovýmennej membrány na iónovú výmenu jednomocných katiónov oproti dvojmocným katiónom na zlepšenie možnosti sušiť koncový produkt rozprašovaním.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Postup na prípravu kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa
 - a) použitie aspoň jedného organizmu, ktorý produkuje kyselinu D-pantoténovú a v ktorom je biosyntéza kyseliny pantoténovej (pan) a/alebo izoleucínu/valínu (ilv) deregulovaná a ktorý tvorí aspoň 2 g/l solí kyseliny D-pantoténovej fermentáciou v kultivačnom médiu, pričom sa do kultivačného média dodáva 0 – 20 g/l voľného β -alanínu a/alebo soli β -alanínu,
 - b) prechod fermentačného roztoku obsahujúceho D-pantotenát cez jednu alebo viacero iónovo selektívnych membrán aplikovaním elektrického poľa, pričom sa z roztoku obsahujúceho D-pantotenát odstraňujú nízkomolekulové ióny,
 - c) pridanie vápenatej bázy a/alebo horečnatej bázy, aby sa voľná kyselina D-pantoténová obsiahnutá v roztoku upravila na pH 3 – 10, pričom sa získa roztok, ktorý obsahuje pantotenát vápenatý a/alebo horečnatý, a
 - d) podrobenie roztoku obsahujúceho pantotenát vápenatý a/alebo pantotenát horečnatý sušeniu a/alebo formulácii.
2. Postup podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že do kultivačného média sa nedodáva žiadny voľný β -alanín a/alebo soľ β -alanínu.
3. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 a 2, vyznačujúci sa tým, že použitým organizmom produkujúcim kyselinu D-pantoténovú je baktéria, kvasinka alebo pleseň.
4. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, vyznačujúci sa tým, že použitým mikroorganizmom je baktéria z čeľade Bacillaceae.
5. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, vyznačujúci sa tým, že sa používa baktéria rodu *Bacillus* a s výhodou druhy *B. subtilis*, *B. licheniformis* alebo *B. amyloliquefaciens*.

6. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, vyznačujúci sa tým, že v kroku a) sa vytvorí obsah kyseliny D-pantoténovej a/alebo jej solí najmenej 10 g/l kultivačného média, s výhodou najmenej 20 g/l, s osobitnou výhodou najmenej 40 g/l a s najväčšou výhodou najmenej 60 g/l kultivačného média.
7. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, vyznačujúci sa tým, že v kroku c) sa pH roztoku nastaví na 5 – 10.
8. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, vyznačujúci sa tým, že v kroku c) sa pH roztoku nastaví na 5 – 9, s výhodou 6 – 9 a s osobitnou výhodou 6 – 8.
9. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, vyznačujúci sa tým, že v kroku b) sa používajú monopolárne a/alebo bipolárne iónovymenné membrány.
10. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, vyznačujúci sa tým, že v kroku b) sa používajú monopolárne iónovymenné membrány.
11. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 10, vyznačujúci sa tým, že v kroku b) sa používajú monoselektívne iónovymenné membrány.
12. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11, vyznačujúci sa tým, že pH fermentačného roztoku obsahujúceho kyselinu D-pantoténovú je pred spracovaním v kroku b) nastavený na izoelektrické pH kyseliny D-pantoténovej.
13. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 12, vyznačujúci sa tým, že v kroku b) sa pre monopolárne iónovymenné membrány nastaví prúdové hustoty 1 – 100 mA/cm², s výhodou 10 – 80 mA/cm² a s osobitnou výhodou 20 – 40 mA/cm².
14. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 13, vyznačujúci sa tým, že v kroku b) sa pre bipolárne iónovymenné membrány nastaví prúdové hustoty 1 – 150 mA/cm², s výhodou 30 – 100 mA/cm² a s osobitnou výhodou 70 – 90 mA/cm².
15. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 14, vyznačujúci sa tým, že v kroku b) je obsah jednomocných katiónov, s výhodou amónnych, draselných a/alebo sodných iónov, znížený na koncentráciu ≤ 1 g/kg roztoku.

16. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 15, vyznačujúci sa tým, že pri neutralizácii sa do roztoku v kroku c) pridáva hydroxid vápenatý, uhličitan vápenatý, oxid vápenatý, hydroxid horečnatý a/alebo bázičný uhličitan horečnatý vo forme tuhej látky a/alebo ako vodná suspenzia.
17. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 16, vyznačujúci sa tým, že do roztoku sa v kroku c) pridá vodná suspenzia obsahujúca 2 – 55 % hmotnostných, s výhodou 10 – 50 % hmotnostných a s osobitnou výhodou 20 – 40 % hmotnostných hydroxidu vápenatého.
18. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 17, vyznačujúci sa tým, že do roztoku sa v kroku c) pridá vodná suspenzia obsahujúca 2 – 65 % hmotnostných, s výhodou 10 – 50 % hmotnostných a s osobitnou výhodou 20 – 40 % hmotnostných uhličitanu vápenatého.
19. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18, vyznačujúci sa tým, že do roztoku sa v kroku c) pridá vodná suspenzia obsahujúca 20 – 60 % hmotnostných, s výhodou 10 – 50 % hmotnostných a s osobitnou výhodou 20 – 40 % hmotnostných hydroxidu horečnatého.
20. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 19, vyznačujúci sa tým, že do roztoku sa v kroku c) pridá vodná suspenzia obsahujúca 2 – 25 % hmotnostných, s výhodou 10 – 20 % hmotnostných bázičného uhličitanu horečnatého.
21. Postup podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 20, vyznačujúci sa tým, že v kroku c) alebo d) získava alebo nanáša suspenzia, ktorá obsahuje pantotenát vápenatý a/alebo pantotenát horečnatý.
22. Kompozícia na použitie ako krmivová prísada a/alebo krmivový doplnok, vyznačujúca sa tým, že ju možno pripraviť nasledujúcimi krokmi:
 - a) použitie aspoň jedného organizmu, ktorý produkuje kyselinu D-pantoténovú a v ktorom je biosyntéza kyseliny pantoténovej (pan) a/alebo izoleucínu/valínu (ilv) deregulovaná a ktorý tvorí aspoň 2 g/l solí kyseliny D-pantoténovej fermentáciou

v kultivačnom médiu, pričom sa do kultivačného média dodáva 0 – 20 g/l, s výhodou 0 g/l voľného β -alanínu a/alebo soli β -alanínu,

b) prechod fermentačného roztoku obsahujúceho D-pantotenát cez jednu alebo viacero iónovo selektívnych membrán aplikovaním elektrického poľa, pričom sa z roztoku obsahujúceho D-pantotenát odstraňujú nízkomolekulové ióny,

c) pridanie vápenatej bázy a/alebo horečnatej bázy, aby sa voľná kyselina D-pantoténová obsiahnutá v roztoku upravila na pH 3 – 10, pričom sa získa roztok, ktorý obsahuje pantotenát vápenatý a/alebo horečnatý, a

d) podrobenie roztoku obsahujúceho pantotenát vápenatý a/alebo pantotenát horečnatý sušeniu a/alebo formulácii.

23. Kompozícia podľa nároku 22, vyznačujúca sa tým, že v kroku c) alebo d) získava alebo je prítomná suspenzia, ktorá obsahuje pantotenát vápenatý a/alebo pantotenát horečnatý.
24. Kompozícia podľa ktoréhokoľvek z nárokov 22 a 23, vyznačujúca sa tým, že obsahuje soli kyseliny D-pantoténovej vo forme dvojmocných katiónov, s výhodou D-pantotenát vápenatý a/alebo D-pantotenát horečnatý.
25. Kompozícia podľa ktoréhokoľvek z nárokov 22 až 24, vyznačujúca sa tým, že obsahuje soli kyseliny D-pantoténovej v koncentrácii najmenej 1 – 100 % hmotnostných, s výhodou najmenej 20 – 100 % hmotnostných a s osobitnou výhodou najmenej 50 % hmotnostných.
26. Kompozícia podľa ktoréhokoľvek z nárokov 22 až 25, vyznačujúca sa tým, že obsah solí kyseliny D-pantoténovej vo forme jednomocných katiónov je ≤ 1 g/kg.