

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 2244

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.02.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.02.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/10108222**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003**

(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP02/01755**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/066665**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

C 12 P 13/02

A 23 K 1/16

(71) Přihlašovatel:

BASF AKTIENGESSELLSCHAFT, Ludwigshafen, DE;

(72) Původce:

Beck Christine, Mannheim, DE;

Harz Hans-Peter, Dubenhofen, DE;

Klein Daniela, Mannheim, DE;

Leemann Martin, Bensheim, DE;

Lohscheidt Markus, Mannheim, DE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby kyseliny D-pantothenové a/nebo
jejích solí jako přísady do zvířecích krmiv**

(57) Anotace:

Řešení se týká zlepšeného způsobu výroby kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí a jejich použití jako přísady do zvířecích krmiv.

Způsob výroby kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí jako přísady do zvířecích krmiv

Oblast techniky

Předložený vynález se týká zlepšeného způsobu výroby kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí a použití jako přísady do zvířecích krmiv.

Dosavadní stav techniky

Jako výchozí produkt pro biosyntézu koenzymu A je D-pantothenát v rostlinném a zvířecím světě široce rozšířen. Na rozdíl od člověka, který přijímá kyselinu pantothenovou v dostatečném množství ve výživě jsou však jak u rostlin tak i u zvířat často popisovány jevy nedostatku D-pantothenátu. Dostupnost D-pantothenátu je proto značným hospodářským zájmem, obzvláště v krmivářském průmyslu.

Obvyklým způsobem se provádí výroba D-pantothenátu chemickou syntézou z D-pantolaktonu a kalcium- β -alaninátu (Ullmann s Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6. vydání, 1999, elektronická verze, kapitola "Vitamins"). K přípravě D-pantolaktonu je nutné nákladné klasické štěpení racemátu přes diastereomerní soli. Výsledný prodejní produkt z chemické syntézy je většinou vápenatá sůl kyseliny D-pantothenové kalcium-D-pantothenát.

Oproti chemické syntéze má biotechnologický způsob výroby pomocí mikroorganismů výhodu v selektivní (čisté enanciomery) přípravě D-formy kyseliny pantothenové, zhodno-

titelné vyššími organismy. Tím odpadá nákladné štěpení racemátu, které je nutné při chemické syntéze.

Fermentativní způsoby výroby kyseliny D-pantothenové pomocí mikroorganismů jsou běžně známy, mezi jiným z 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.

Tak popisuje EP 1 006 189 a EP 1 001 027 způsob výroby pantothenátu, při kterém se ve fermentačním roztoku dosáhne obsah nejvýše 1 g/l kyseliny D-pantothenové. Takový nepatrný obsah kyseliny pantothenové ve fermentačním roztoku, tedy méně než 10 % hmotnostních, vztaženo na obsah pevné látky, je však pro hospodárnou výrobu doplňků zvířecího krmiva obsahujících kyselinu D-pantothenovou nevhodný. Další nevýhodou u dosud popisovaných způsobů je, že izolace produktu z fermentačního media vyžaduje početné a nákladné zpracovatelské kroky. Hospodárný způsob výroby ve velkoprodučním technickém měřítku není zveřejněn.

Ve vykládacím spisu DE 100 16 321 se popisuje způsob fermentace k výrobě doplňků zvířecího krmiva obsahujících kyselinu D-pantothenovou. Podstatnou nevýhodou tohoto způsobu je však, stejně jako u výše uvedeného fermentativního způsobu výroby kyseliny D-pantothenové, že se mikroorganismům pomocí fermentačního media musí nutně dodávat předstupeň kyseliny pantothenové, β -alanin, aby se dosáhlo hospodárných výtěžků požadovaného produktu.

Dále popisují US 6 013 492 a WO 96/332839 zpracování kyseliny D-pantothenové z fermentačního roztoku odfiltrováním nerozpustných podílů (příkladně buněčný materiál) z

kultivačního media, adsorpcí filtrátu na aktivním uhlí, následnou elucí kyseliny D-pantothenové organickým rozpouštědlem, s výhodou methanolem, neutralizací hydroxidem vápenatým a konečně krystalizací kalcium-D-pantothenátu. Podstatnými nevýhodami jsou ztráty cenného produktu, ke kterým dochází při krystalizaci a rovněž používání organického rozpouštědla, které se z produktu jen těžko odstraňuje a vyvolává nutnost nákladného zpětného získávání rozpouštědla.

EP 0 590 857 popisuje způsob fermentace k výrobě kyseliny D-pantothenové, při kterém se při kultivaci mikroorganismu nutně vyžaduje dokrmování β -alaninem. Fermentační roztok se k oddělení biomasy filtruje, potom se vede přes kationtoměnič a následně přes aniontoměnič, potom se neutralizuje hydroxidem vápenatým, odpaří se, smíchá s aktivním uhlím, ještě jednou se přefiltruje a krystaluje se za přídavku methanolu a chloridu vápenatého. Výsledný produkt obsahující kalciumpantothenát vedle kyseliny D-pantothenové ve formě její vápenaté soli obsahuje ještě chlorid vápenatý v molárním poměru 1 : 1. K redukci obsahu chloridu vápenatého je nutná elektrodialýza s následným sušením rozstříkáním. Tento způsob má nevýhodu, že pro velký počet nákladných procesních kroků a používání organických rozpouštědel není ani ekonomický ani ekologický.

Úkolem předloženého vynálezu je dát k dispozici doplněk zvířecího krmiva obsahující kyselinu D-pantothenovou a/nebo její soli a rovněž jeho výrobu zlepšeným způsobem výroby kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí, který by neměl výše uvedené nevýhody. Přitom je z ekonomických důvodů žádoucí takový způsob, při kterém se dokrmování β -alaninu výrazně redukuje nebo dokonce není nutné. Dále je žádoucí výroba kyseliny D-pantothenové ve formě jejích dvojsytných

25.08.03

solí a zde především solí kovů alkalických zemin, protože dvojsytné soli mají méně hygroskopické vlastnosti než jedno-sytné soli kyseliny D-pantothenové a pro další použití, příkladně jako doplněk zvířecího krmiva tak mají méně výraz-ný sklon ke spékání.

Tento úkol byl výhodným způsobem vyřešen předloženým vynálezem.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je způsob výroby kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí, vyznačující se tím, že

- a) se použije nejméně jeden organismus produkující ky-selinu D-pantothenovou, jehož biosyntéza kyseliny pantothénové-(pan) a/nebo isoleucin/valin-(ilv) je deregulovaná a v kultivačním mediu se fermentací tvoří nejméně 2 g/l solí kyseliny D-pantothenové, přičemž se do kultivačního media uvádí 0 až 20 g/l volného β -alaninu a/nebo solí β -alaninu,
- b) fermentační roztok obsahující D-pantothenát se ve-de přes aniontoměnič,
- c) na aniontoměniči vázaný D-pantothenát se eluuje roztokem obsahujícím anorganické nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli ve formě D-panto-thenátu vápenatého a/nebo hořečnatého nebo se eluuje roztokem kyseliny chlorovodíkové ve formě kyseliny D-pantothenové,

- d) popřípadě volná kyselina D-pantothenová, obsažená v roztoku, se přidavkem vápenaté a/nebo hořečnaté báze upraví na hodnotu pH 3 až 10, přičemž se získá roztok, který obsahuje kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát a
- e) eluát nebo roztok, obsahující kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát se podrobí sušení a/nebo tvorbě formulace.

Při jedné variantě způsobu podle vynálezu se vyznačuje předložený způsob tím, že se v kroku d) nebo e) získá nebo předloží suspenze, která obsahuje pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý.

Fermentace podle vynálezu, probíhající v kroku a), se může provádět známými způsoby šaržovým provozem, šaržovým provozem s dávkováním, opakovaným šaržovým provozem s dávkováním nebo kontinuálním způsobem vedení procesu. K neutralizaci vznikající kyseliny pantothenové se přitom využívají obvyklé pufrovací systémy, jako je příkladně fosfátový pufr s hydroxidem sodným, hydroxidem draselným nebo s amoniakem.

V další variantě způsobu podle vynálezu se v kroku a) tvoří fermentací v kultivačním mediu nejméně 10 g/l, s výhodou nejméně 20 g/l, obzvláště výhodně nejméně 40 g/l, nanejvýš výhodně nejméně 60 g/l a zvláště nejméně 70 g/l solí kyseliny D-pantothenové.

Podle vynálezu se formulací "produkovat" rozumí, že organismus může syntetizovat větší množství kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí, než je nutné pro vlastní

potřebu látkové výměny. V jedné výhodné variantě podle vynálezu se nevyskytuje syntetizované množství kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí interně v buňkách, nýbrž jsou z organismu ideálním způsobem vylučovány do kultivačního media. Toto vylučování se může provádět aktivně nebo pasivně o sobě známými mechanismy.

Podle vynálezu se jako organismy, produkující kyselinu D-pantothenovou, použijí mikroorganismy. K nim patří podle vynálezu houby, kvasinky a/nebo bakterie. Podle vynálezu jsou výhodné houby jako příkladně *Mucor* nebo kvasinky, jako příkladně *Saccharomyces* nebo *Debaromyces*, s výhodou se použije *Saccharomyces cerevisiae*. S výhodou se podle vynálezu použijí coryneformní bakterie nebo *Bacillaceae*. Podle vynálezu jsou s výhodou zahrnuty příkladně bakterie druhů *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Acinetobacter* nebo *Rhizobium*. Obzvláště výhodné jsou zde příkladně *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium breve* nebo *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 další druhy bacilů ze skupiny 1, které jsou charakterizovány jejich 16sRNA nebo *Actinum mycetalis*. Tento výčet slouží vysvětlení a v žádném případě není pro předložený vynález limitující.

Navíc zahrnuje předložený vynález také použití geneticky změněných organismů k výrobě doplňku zvířecího krmiva podle vynálezu, obsahujícího volnou kyselinu D-pantothenovou a/nebo její soli. Takové geneticky změněné organismy se mohou příkladně izolovat chemickou mutagenezí a následnou

selekcí vhodným "screeningovým způsobem". Podle vynálezu jsou zahrnuty také tak zvané "produkční kmeny", které jsou vhodné k výrobě produktu ve smyslu předloženého vynálezu a vykazují genetické změny z hlediska toku látkové výměny ve směru kyseliny D-pantothenové, přičemž jsou také zahrnuty změny z hlediska vylučování kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí přes buněčnou membránu. Toho je možné dosáhnout příkladně změnami v klíčovách pozicích relevantních cest biosyntézy při látkové výměně použitého organismu.

Možné je také použití transgeních organismů, které resultují z přenosu homologních a/nebo heterologních sekvencí nukleotidů, které jsou nutné k syntéze požadovaného produktu nebo mohou být nápomocné. Možná je přitom přeexprese a/nebo deregulace jednoho nebo několika genů jednotlivě a/nebo v kombinaci, lokalizovaných v genomu a/nebo na jeden vektor.

Transgení organismy takového druhu mohou s výhodou obsahovat dodatečné kopie a/nebo geneticky změněné geny, vybrané ze skupiny panB, panC, panD, panE a/nebo jejich kombinací a/nebo dokonce organizační jednotky, jako je operon BCD. Dále mohou být do organismů s výhodou manipulovány další cesty látkové výměny, jako příkladně cesta biosyntézy isoleucin-valorinu, jak se popisuje příkladně v EP 1 006 189, EP 1 006 192, EP 1 006 193 nebo EP 1 001 027. Tím jsou ve zvýšené míře dány k dispozici výchozí sloučeniny pro biosyntézu kyseliny pantothenové s rozvětvenými řetězci. S výhodou se případně geny pro tuto cestu biosyntézy, to znamená ilvB, ilvN, ilvC a/nebo ilvD přeexprimují.

Navíc jsou podle vynálezu do použitých organismů produkujících kyselinu pantothenovou zahrnuty genetické změny

25.08.03

aspartát- α -dekarboxylázy (panD), příkladně přeexpresí a/nebo deregulací.

Termínem "deregulace" se podle vynálezu rozumí následující :

Změna nebo modifikace nejméně jednoho genu, který koduje pro enzym při biosyntetické cestě látkové výměny, takže aktivita enzymu v mikroorganismu je změněna nebo modifikována. Výhodné je, aby nejméně jeden gen, který koduje pro enzym při biosyntetické cestě látkové výměny byl změněn takovým způsobem, aby se produkt genu tvořil intenzivněji nebo aby vykazoval zvýšenou aktivitu. Pojem "deregulovaná cesta látkové výměny" zahrnuje také biosyntetickou cestu látkové výměny, při které je více jak jeden gen, který koduje pro více jak jeden enzym změněn nebo modifikován tak, aby byly změněny nebo modifikovány aktivity více jak jednoho enzymu.

Změny nebo modifikace mohou zahrnovat, avšak nejsou omezeny na :

Odstranění endogeního promotoru nebo regulačních prvků; zavedení silných promotorů, indukovatelných promotorů nebo několika promotorů zároveň; odstranění regulačních sekvencí, takže se změní exprese genového produktu; změna chromosomální polohy genu; změna sekvence DNA v blízkosti genu nebo uvnitř genu jako je příkladně ribosomální místo vazby (RBS); zvýšení počtu kopií genu v genomu nebo různý počet kopií vnesením plasmidů; modifikace proteinů (příkladně regulačních proteinů, supresorů, enhancerů, transkriptionálních aktivátorů a podobně), které hrají roli při transkripci genu a/nebo při translaci na produkt genu. K tomu patří také všechny další možnosti k deregulaci exprese genů podle stavu techniky jako příkladně použití antisense-oleonukleotidů

nebo blokace represorových proteinů.

Deregulace může také zahrnovat změny v kodující oblasti genů, které příkladně vedou k posílení feedback-regulace v produktu genu nebo k větší nebo menší specifické aktivitě produktu genu.

Navíc jsou podle vynálezu výhodné genově technické změny na enzymech, které ovlivňují úbytek výchozích látek pro kyselinu pantothenovou a/nebo přesun kyseliny pantothenové na koenzym A. Kodující geny pro takové enzymy jsou příkladně : alsD, avtA, ilvE, ansB, coaA, coaX a další. Tento výčet slouží vysvětlení a v žádném případě není limitující pro předložený vynález.

Dále jsou výhodné genově technické změny, které zajišťují celulózní dostupnost kofaktorů (příkladně methylen-tetrahydrofolát, redox-ekvivalenty a jiné) v množství optimálním pro produkci kyseliny pantothenové.

S výhodou je dostupný β -alanin již v buňkách ve zvýšené koncentraci oproti odpovídajícím geneticky nezměněným organismům a nemusí se tak přidávat do kultivačního media jako prekursor, jak se požaduje příkladně podle EP-A 0 590 857. Výhodné jsou mikroorganismy, jejichž biosyntéza kyseliny pantothenové (pan)- a/nebo isoleucinu-valinu-(ilv)- a/nebo asparátu- α -dekarboxyláza jsou deregulované. Dále je výhodná dodatečná přeexprese ketopanthoátu-reduktázy (panE) v mikroorganismech.

Dále je podle vynálezu výhodné, jestliže případně coaA-gen, který je nutný pro syntézu koenzymu A, má sníženou aktivitu nebo (příkladně v druzích Bacillus) je zcela

25.08.03

vyřazen. *Bacillus* totiž obsahuje vedle *coaA* další gen pro tuto enzymatickou funkci (= *coaX*). Také aktivita tohoto genu *coaX* nebo korespondujících enzymů se může změnit, s výhodou snížit, nebo dokonce deletovat, pokud *coaA* samotný vykazuje ještě dostatečnou, i když sníženou enzymatickou aktivitu, to znamená, že enzymatická aktivita *coaA* není zcela potlačena. Vedle přeeexprese různých genů je výhodná také genová manipulace oblasti promotorů těchto genů takovým způsobem, aby tato manipulace vedla k přeexpresi produktu genů.

V jedné variantě provedení předloženého vynálezu se použijí kmeny bakterií podle přílohy (PCT/US přihlášky 0025993), jako je příkladně *Bacillus subtilis* PA 824 a/nebo jeho deriváty. V jedné výhodné variantě provedení podle vynálezu se použije ke způsobu podle vynálezu mikroorganismus *Bacillus subtilis* PA 668, který se popisuje v příloze (US-Serial-Nr. 60/262 995). Tyto kmeny *Bacillus subtilis* PA 824 a PA 668 se vyrobí následovně :

Vychází se z kmene *Bacillus subtilis* 168 (kmen Marburg ATCC 6051), který vykazuje genotyp *trpC2* (Trp^-), ze kterého se transdukcí Trp^+ markeru (z *Bacillus subtilis* divoký typ W 23) vyrobí kmen PY 79. Do kmene PY 79 se klasickými metodami genových technologií (jak popisuje příkladně Harwood, C.R. a Cutting, S.M. (vydavatel) *Molecular Biological Methods for Bacillus* (1990) John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, Anglie) zavedou mutace *deltapanB* a *deltapanE1*.

Výsledný kmen se transformuje genomickou DNA kmene *Bacillus subtilis* PA 221 (genotyp $\text{P}_{26\text{panBCD}}$, *trpC2* (Trp^-)) a genomickou DNA kmene *Bacillus subtilis* PA 303 (genotyp $\text{P}_{26\text{panE1}}$). Výsledný kmen PA 327 má genotyp $\text{P}_{26\text{panBCD}}$, $\text{P}_{26\text{panE1}}$ a je tryptofaně auxotrofní (Trp^-). Se kmenem Ba-

25.08.03

Bacillus subtilis PA 327 se vloží do 10 ml kultury s médiem SVY (25 g/l Difco Veal Infusion Broth, 5 g/l Difco Yeast Extract, 5 g/l glutamátu sodného, 2,7 g/l síranu amonného ve 740 ml vody, autoklávuje se, následně se přidá 200 ml 1 M fosforečnanu draselného, pH 7,0 a 60 ml 50 %-ního sterilního roztoku glukózy), ke kterému se přidá 5 g/l β -alaninu a 5 g/l α -ketoisovalerátu a dosáhne se titru kyseliny pantothenové až 3,0 g/l (24 hodin).

Výroba kmene *Bacillus subtilis* PA 221 (genotyp $P_{26}panBCD$, *trpC2* (Trp^-)) se popisuje v následujícím odstavci :

Klasickými metodami genových technik se s pomocí sekvencí informací operonu *panBCD* *E. coli* (viz Merkel a spol., FEMS Microbiol. Lett., 143, 1996:247-252), přičemž se vychází z *Bacillus subtilis* GP 275 plasmidové knihovny se klonuje operon *panBCD* *Bacillus*. Ke klonování se použije kmen *E. coli* BM4062 (*bir^{ts}*) a informace, že operon *Bacillus* leží v blízkosti genu *birA*. Operon *panBCD* se zavede do replikovatelného plasmidu *E. coli*. Ke zlepšení exprese operonu *panBCD* se použijí silné, konstitutivní promotory *Bacillus subtilis* fágy SP01 (P_{26}) a místo napojení ribosomu (= RBS) před *panB*-genem se nahradí umělým RBS. Před kazetu $P_{26}panBCD$ na plasmidu se liguje fragment DNA, který leží bezprostředně *upstream* nativního genu *panB* v *Bacillus*. Tento plasmid se transformuje v kmenu *Bacillus subtilis* RL-1 (klasickou mutagenézí získaný derivát *Bacillus subtilis* 168 (kmen Marburg ATCC 6051), genotyp *trpC2* (Trp^-)) a homologovou rekombinací se nahradí nativní operon *panBCD* operonem $p_{26}panBCD$. Výsledný kmen se jmenuje PA 221 a má genotyp $P_{26}panBCD$, *trpC2* (Trp^-). Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 221 se v 10 ml kultury s médiem SVY, které se doplní 5 g/l β -alaninu a 5 g/l α -ketoisovalerátu se dosáhne

titru kyseliny pantothenové až 0,92 g/l (24 hodin).

Výroba kmene *Bacillus subtilis* PA 303 (genotyp $P_{26}panE1$) se popisuje v následujícím odstavci :

S pomocí genové sekvence *E. coli* panE se analogicky klonuje sekvence *Bacillus* panE. Ukazuje se, že v *Bacillus subtilis* existují dva homology genu panE *E. coli*, které se označují jako panE1 a panE2. Deleční analýzou se ukazuje, že gen panE1 vyvolává 90 % produkce kyseliny pantothenové, zatímco delece genu panE2 nemá žádný významný efekt na produkci kyseliny pantothenové. Také zde byl analogicky ke klonování operonu panBCD nahrazen promotor silněji konstitutivním promotorem P_{26} a místo napojení ribosomu před genem panE1 se nahradí uměle vytvořeným místem vazby. Fragment $P_{26}panE1$ se klonuje do vektoru, který je vytvořen tak, aby fragment $P_{26}panE1$ se mohl integrovat do originální pozice panE1 v genomu *Bacillus subtilis*. Po transformaci a homologní rekombinaci se výsledný kmen jmenuje PA 303 a má genotyp $P_{26}panE1$. Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 303 se v 10 ml kultury s médiem SVY, které se doplní 5 g/l β -alaninu a 5 g/l α -ketoisovalerátu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 1,66 g/l (24 hodin).

Další konstrukce kmene se provádí transformací PA 327 plasmidem, který obsahuje operon $P_{26}IlvBNC$ a markerový gen pro spectinomycin. Operon $P_{26}IlvBNC$ integruje do pozice amyE, což bylo prokázáno pomocí PCR. Transformanty se označují jako PA 340 (genotyp $P_{26}panBCD$, $P_{26}panE1$, $P_{26}IlvBNC$, specR, trpC2 (Trp^-)).

Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 340 se v 10 ml kultury s médiem SVY, které se doplní pouze 5 g/l β -alaninu dosáhne

titru kyseliny pantothenové až 3,6 g/l (24 hodin), v 10 ml kultury s mediem SVY, které se doplní 5 g/l β -alaninu a 5 g/l α -ketoisovalerátu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 4,1 g/l (24 hodin).

Dále byla uvedena do kmene PA 340 deregulovaná kazeta *ilvD*. K tomu se plasmid, který obsahuje *ilvD* gen za kontroly promotoru P_{26} s artificiální RBS2 transformuje v PA 340. Přitom se gen $P_{26}ilvD$ integruje homologickou rekombinací do originální pozice *ilvD*. Výsledný kmen PA 374 má genotyp $P_{26}panBCD$, $P_{26}panE1$, $P_{26}ilvBNC$, $P_{26}ilvD$, *specR* a *trpC2* (Trp^-).

Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 374 v 10 ml kultury s mediem SVY, které se doplní pouze 5 g/l β -alaninu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 2,99 g/l (24 hodin).

Aby bylo možné s kmenem PA 374 produkovat kyselinu pantothenovou bez dokrmování β -alaninu, byly do kmene PA 374 zavedeny dodatečné kopie genu *panD* kodující pro asparát- α -dekarboxylázu. K tomu se transformuje chromosomální DNA kmene PA 401 na PA 374. Selekcí na tetracyklin se získá kmen PA 377.

Výsledný kmen PA 377 má genotyp $P_{26}panBCD$, $P_{26}panE1$, $P_{26}ilvBNC$, $P_{26}ilvD$, *specR*, *tetR* a *trpC2* (Trp^-).

Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 377 v 10 ml kultury s mediem SVY bez doplňování výchozích sloučenin se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 1,31 g/l (24 hodin).

Výroba kmene *Bacillus subtilis* PA 401 (genotyp $P_{26}panD$) se popisuje v následujícím odstavci :

25.08.03

Bacillus subtilis panD se klonuje panBCD operonu do vektoru, který nese tetracyklinový markerový gen. Před panD se klonuje promotor P₂₆ a výše popsaná artificiální RBS. Restriktivním trávením se vyrobí fragment, který obsahuje tetracyklinový markerový gen a a gen P₂₆panD. Tento fragment se religuje a transformuje do výše popsaného kmene PA 221. Přitom fragment integruje do genomu kmene PA 221. Výsledný kmen PA 401 má genotyp P₂₆panBCD, P₂₆panD, tetR a trpC2 (Trp⁻).

Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 401 se v 10 ml kultury s médiem SVY, které se doplní 5 g/l α -ketoisovalerátu dosáhne titru kyseliny pantothenové až 0,3 g/l (24 hodin). V 10 ml kultury s médiem SVY, které se doplní 5 g/l kyseliny D-pantoinové a 10 g/l L-aspartátu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 2,2 g/l (24 hodin).

S výchozím kmenem PA 377 se transformací s chromosomální DNA kmene PY 79 generuje tryptofan-prototrofní kmen. Tento kmen PA 824 má genotyp P₂₆panBCD, P₂₆panE1, P₂₆ilvBNC, P₂₆ilvD, specR, tetR a Trp⁺.

Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 824 v 10 ml kultury s médiem SVY bez doplňování výchozích sloučenin se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 4,9 g/l (48 hodin) (srovnání PA 377 : až 3,6 g/l za 48 hodin).

Výroba PA 668 se popisuje v následujícím odstavci :

Gen *Bacillus* panB se klonuje z divokého typu operonu panBCD a insertuje do vektoru, který vedle genu rezistentního na chloramfenikol obsahuje také sekvence *B. subtilis* vpr locus.

25.08.03

Silně konstitutivní promotor P_{26} se zavede před 5'-konec genu panB. Fragment, který obsahuje gen P_{26} panB, markerový gen pro chloramfenikovou rezistenci a rovněž sekvence *Bacillus subtilis* vpr se získá restrikčním trávením. Isolovaný fragment se religuje a transformuje jím kmen PA 824. Získaný kmen se označuje PA 668. Genotyp PA 668 je P_{26} panBCD, P_{26} panE1, P_{26} ilvBNC, P_{26} ilvD, P_{26} panB, specR, tetR, CmR a Trp⁺.

Izolují se dvě kolonie PA 668 a označí se PA 668-2A a druhá PA 668-24.

Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 668-2A se v 10 ml kultury s médiem SVY bez doplňování výchozích sloučenin dosáhne titru kyseliny pantothenové až 1,5 g/l ve 48 hodinách. V 10 ml kultury doplněné 10 g/l aspartátu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 5 g/l.

Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 668-24 se v 10 ml kultury s médiem SVY bez doplňování výchozích sloučenin dosáhne titru kyseliny pantothenové až 1,8 g/l ve 48 hodinách. V 10 ml kultury doplněné 10 g/l L-aspartátu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 4,9 g/l.

Přesná konstrukce kmenů se popisuje v přílohách PCT/US-příhlášky 0025993 a v US-Serial-Nr. 60/262,995.

S výše popsaným kmenem PA 377 se při fermentaci limitované glukózou v mediu SVY (25 g/l Difco Veal Infusion Broth, 5 g/l Difco Yeast Extract, 5 g/l tryptofanu, 5 g/l Na-glutamátu, 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 natriumcitrátu,

25.08.03

0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ a 1 ml/l roztoku stopových solí o následujícím složení : 0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g H_3BO_3 , 0,7 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 1,6 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, doplněno vodou na 1 l) se v měřítku 10 l při kontinuálním dokrmování roztoku glukózy dosáhne za 36 hodin (48 hodin) koncentrací kyseliny pantothenové ve fermentační břečce 18 až 19 g/l (22 až 25 g/l).

Při fermentaci PA 824 limitované glukózou, tryptofan-prototrofní derivát PA 377 v mediu s kvasnicovým extraktem (10 g/l Difco Yeast Extract, 5 g/l Na-glutamátu, 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 natriumcitrátu, 0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ a 1 ml/l výše popsaného roztoku stopových solí) se v měřítku 10 l při kontinuálním dokrmování roztoku glukózy dosáhne za 36 hodin, 48 hodin a 72 hodin následných koncentrací kyseliny pantothenové ve fermentační břečce : 20 g/l, 28 g/l a 36 g/l.

Další optimalizací media se kmenem PA 824 se při fermentaci limitované glukózou dosáhne v mediu sestávajícím z 10 g/l Difco Yeast Extract, 10 g/l NZ-aminu A (Quest International GmbH, Erftstadt), 10 g/l Na-glutamátu, 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 natriumcitrátu, 0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ a 1 ml/l výše popsaného roztoku stopových solí se v měřítku 10 l při kontinuálním dokrmování roztoku glukózy dosáhne za 36 hodin (48 hodin) koncentrace kyseliny pantothenové ve fermentační břečce 37 g/l (48 g/l).

Je možné další zvyšování koncentrace kyseliny pantothenové ve fermentační břečce optimalizací media, prodlouže-

ním doby fermentace, zlepšováním procesu a kmene, a rovněž kombinací jednotlivých kroků. Tak je možné dosáhnout výše popsaných koncentrací kyseliny pantothenové také fermentací kmenů, které jsou deriváty výše popsaného PA 824. Deriváty se mohou vyrábět klasickým vývojem kmene a rovněž dalšími genově technickými manipulacemi. Vývojem medií, kmenů a způsobu fermentace se může titr kyseliny pantothenové ve fermentační břečce zvýšit i nad 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l.

Podstatnou výhodou způsobu podle vynálezu je, že se fermentace provádí v kultivačním mediu, které kromě nejméně jednoho zdroje uhlíku a dusíku jako výchozích sloučenin neobsahuje žádné další předstupně (prekurzory). To znamená, že biosyntéza kyseliny D-pantothenové je nezávislá na dokrmování dalších výchozích látek. Jako takové výchozí látky se podle vynálezu rozumí příkladně β -alanin nebo L-aspartát a/nebo L-valin a/nebo α -ketoisovalerát a/nebo jejich kombinace.

V jedné výhodné variantě způsobu podle vynálezu se provádí fermentace organismů produkujících kyselinu D-pantothenovou v kultivačním mediu, které obsahuje jeden zdroj uhlíku a jeden zdroj dusíku, ke kterému se ale nepřidává žádný volný β -alanin a/nebo soli β -alaninu a to ani v průběhu fermentace. To znamená, že k výrobě kyseliny D-pantothenové v rozmezí nejméně 10 g/l kultivačního media, s výhodou nejméně 20 g/l, obzvláště výhodně nejméně 40 g/l, zcela obzvláště výhodně nejméně 60 g/l a obzvláště nejméně 70 g/l není podle vynálezu nutné žádné dokrmování volného β -alaninu a/nebo solí β -alaninu.

Nezávislost na dokrmování výchozích látek představuje

obzvláště významnou ekonomickou výhodou způsobu podle vynálezu oproti známým způsobům, neboť řada výchozích látek je velmi drahá.

Přídavek β -alaninu a/nebo solí β -alaninu však není podle vynálezu vyloučen, takže se může následně výtěžek kyseliny D-pantothenové přidavkem β -alaninu a/nebo solí β -alaninu ještě dále zlepšit. Pokud se příkladně vychází z toho, že potřebné výchozí látky kyseliny pantothenové jsou k dispozici v dostatečném množství a pouze aktivita genu *panD* limituje další nárůst produkce kyseliny D-pantothenové, pak se může příkladně výtěžek kyseliny D-pantothenové zvýšit o dalších 50 % přidavkem volného β -alaninu a/nebo solí β -alaninu.

V jedné výhodné variantě předloženého vynálezu se může ke kultivačnímu mediu přidat až 20 g/l volného β -alaninu a/nebo solí β -alaninu k dodatečnému zvýšení výtěžku kyseliny pantothenové o více jak 50 %. Výhodný je přídavek asi 15 g/l volného β -alaninu a/nebo solí β -alaninu ke kultivačnímu mediu.

Příklady vhodných zdrojů uhlíku podle vynálezu k použití v kultivačním mediu pro fermentaci výše uvedených organismů jsou cukry, jako hydrolyzáty škrobu (mono-, di-, oligosacharidy), s výhodou glukóza nebo sacharóza a rovněž řepná melasa nebo třtinová melasa, proteiny, hydrolyzáty proteinů, sojová moučka, kukuřičná voda, tuky, volné mastné kyseliny, opětovně použité buňky z již provedených fermentací nebo jejich hydrolyzáty a rovněž kvasnicový extrakt. Tento výčet není pro předložený vynález limitující.

Dále se předložený vynález vyznačuje s výhodou tím, že

celkový obsah cukru až do konce fermentace je zredukován na minimum, protože v opačném případě je pozdější sušení a/nebo formulace fermentačního roztoku ztížena slepováním. Toho lze podle vynálezu dosáhnout tím, že se fermentace vede ještě nějaký čas po spotřebování zdroje uhlíku (při kultivaci v šaržovém způsobu) nebo poté, co se přeruší přívod uhlíku (při vedení procesu šaržovým provozem s dávkováním nebo opakovaným šaržovým provozem s dávkováním) a/nebo se reguluje takovým způsobem, že koncentrace zdroje uhlíku je téměř nulová (při vedení procesu šaržovým provozem s dávkováním, opakovaným šaržovým provozem s dávkováním nebo kontinuálním způsobem).

To se podle vynálezu provádí tak, že po přerušení dávkování zdroje uhlíku (příkladně roztoku cukru) se fermentace vede dále až k dosažení koncentrace rozpuštěného kyslíku (pO_2) na nejméně 80 %, s výhodou 90 % a obzvláště výhodně 95 % hodnoty nasycení ve fermentačním roztoku.

Příklady vhodných zdrojů dusíku je amoniak, síran amonný, močovina, proteiny, hydrolyzáty proteinů nebo kvasnicový extrakt. Ani tento výčet není pro předložený vynález limitující.

Dále obsahuje fermentační medium minerální soli a/nebo stopové prvky, jako jsou aminokyseliny a vitaminy. Přesné složení vhodných fermentačních medií jsou opakovaně známé a odborníkům dostupné.

Po inokulaci fermentačního media vhodným organismem produkujícím kyselinu D-pantothenovou (s buněčnou hustotou známou odborníkům) případně po přidání prostředku proti pěnění dochází ke kultivaci organismu. Případně nutná regula-

25.08.03

ce pH hodnoty media se může provádět různými anorganickými nebo organickými louhy nebo kyselinami, jako je příkladně NaOH, KOH, amoniak, kyselina fosforečná, kyselina sírová, kyselina solná, kyselina mravenčí, kyselina jantarová, kyselina citronová a podobně.

Na základě pufrovacích systémů, použitých během fermentace, které mohou být, jak bylo výše popsáno příkladně NaOH, KOH, amoniak, kyselina fosforečná, kyselina sírová, kyselina chlorovodíková, kyselina mravenčí, kyselina jantarová, kyselina citronová a podobně, je vytvořená kyselina pantothenová ve fermentačním roztoku podle použitého pufrovacího systému ve formě dané soli (daných solí). Protože přitom podle vynálezu nejsou výhodné především soli kyseliny D-pantothenové ve formě jejich jednomocných kationtů případně je výhodná kyselina D-pantothenová ve formě jejich vápenatých nebo hořečnatých solí, zpracuje se fermentační roztok podle vynálezu za použití aniontoměníče.

Předložený vynález zahrnuje při tom všechny průmyslově využitelné aniontoměníče. K těmto patří všechny silně nebo slabě bázičné pryskyřice, výhodné jsou silně bázičné pryskyřice. Podle předloženého vynálezu je výhodné použití následujících aniontoměníčů, přičemž tento výčet slouží pouze k objasnění předloženého vynálezu a tento není tím omezen : Lewatit M 500 nebo MP 500 firmy Bayer, Amberlite IRA 402, IRA 410 a IRA 900 firmy Rohm & Haas, Dowex 1x2 nebo 1x8 firmy Dow Chemicals, Dialon PA 306, PA 316, PA 406, PA 412 nebo PA 418 firmy Mitsubishi Chemicals Corporation, jakož i Lewatit MP 62 firmy Bayer, MWA-1 firmy Dow Chemicals, Amberlite IRA 67, IRA 96 SB, IRA 96 RF, Duolite A 561 nebo A 7 firmy Rohm & Haas, Reillex 402 firmy Reilly Industries nebo Dialon WA 21 nebo WA 30 firmy Mitsubishi Chemicals

25.08.03

Corporation.

Použitím aniontoměniče se z fermentačního roztoku váže D-pantothenát a jiné anionty, zatímco ostatní sloučeniny, obzvláště jednomocné kationty, jako je například amonium, draslík nebo sodík, projdou aniontoměničem a potom se vypustí. Tak se nežádoucí kationty výhodně z fermentačního roztoku prakticky úplně odstraní.

D-pantothenát, vázaný na aniontoměnič, se potom podle předloženého vynálezu eluuje roztokem, obsahujícím anorganické nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli ve formě D-pantothenátu vápenatého a/nebo hořečnatého, nebo roztokem kyseliny chlorovodíkové ve formě volné kyseliny pantothenové.

Podle předloženého vynálezu se může jednat o kyselé a/nebo zásadické anorganické a/nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli. Tak je v jedné variantě způsobu podle předloženého vynálezu vhodná eluce D-pantothenátu, vázaného na aniontoměnič, roztokem obsahujícím kyselé anorganické a/nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli. Rovněž je vhodná varianta, ve které jsou v elučním roztoku v kroku c) obsažené anorganické a/nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté báze. Zásadické vápenaté a/nebo hořečnaté soli mohou být obsažené namísto nebo dodatečně ke kyselým vápenatým a/nebo hořečnatým solím. V další variantě způsobu podle předloženého vynálezu může eluční roztok v kroku c) způsobu podle předloženého vynálezu obsahovat kyselé anorganické vápenaté a/nebo hořečnaté soli, kyselé organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli, anorganické vápenaté a/nebo hořečnaté báze a/nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté báze, jakož i jejich odpovídající kombinace.

25.08.03

Výhodně se podle předloženého vynálezu rozumí pod anorganickými vápenatými a/nebo hořečnatými solemi odpovídající halogenidy vápenaté a/nebo hořečnaté. Podle předloženého vynálezu je to výhodně chlorid vápenatý a/nebo chlorid hořečnatý. Jako příklady anorganických vápenatých a/nebo hořečnatých bází je možno uvést hydroxid vápenatý, uhličitan vápenatý, oxid vápenatý, hydroxid hořečnatý nebo uhličitan hořečnatý. Pod pojmem vápenaté a/nebo hořečnaté organické soli se například rozumí ve vodě dobře rozpustné soli organických aniontů. Jako výhodné je možno uvést například mravenčan, octan, propionát, glycinát a/nebo laktát vápenatý a/nebo hořečnatý.

V jedné variantě předloženého vynálezu se D-pantothenát, vázaný na aniontoměnič, eluuje 5 až 10% roztokem chloridu vápenatého nebo chloridu hořečnatého nebo vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, přičemž eluát obsahuje D-pantothenát ve formě D-pantothenátu vápenatého nebo hořečnatého nebo jako volnou kyselinu D-pantothenovou. Pokud se eluce provádí vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, potom se hodnota pH eluátu, obsahujícího volnou kyselinu D-pantothenovou, nastaví přidavkem vápenaté a/nebo hořečnaté báze na 3 až 10. Výhodná je hodnota pH 5 až 10. Výhodné je nastavení hodnoty pH na 5 až 9, obzvláště 6 až 9 a zcela obzvláště výhodně 6 až 8. Tímto způsobem se získá roztok, který obsahuje pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý.

Po přidavku vápenaté a/nebo hořečnaté báze pro nastavení hodnoty pH eluátu, obsahujícího volnou kyselinu D-pantothenovou, se může získat také suspenze, obsahující pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý.

25.08.03

Výhodně se do eluátu, obsahujícímu volnou kyselinu pantothenovou, přidává pro neutralizaci hydroxid vápenatý, uhličitán vápenatý, oxid vápenatý, hydroxid hořečnatý a/nebo bázeický uhličitán vápenatý ve formě pevné látky a/nebo jako suspenze.

Při tom je podle předloženého vynálezu výhodné, když se neutralizace eluátu, obsahujícího volnou kyselinu D-pantothenovou, provádí pomocí vápenaté a/nebo hořečnaté báze ve formě vodné suspenze. Použitím takovéto vodné suspenze probíhá neutralizace rychleji a bez většího kolísání pH, než při použití odpovídající pevné látky.

Způsob podle vynálezu se vyznačuje tím, že se k eluátu popřípadě v kroku d) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 55 % hmotnostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště výhodně 20 až 40 % hmotnostních hydroxidu vápenatého. Podle vynálezu je dále zahrnut způsob, při kterém se k eluátu popřípadě v kroku d) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 65 % hmotnostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště výhodně 20 až 40 % hmotnostních uhličitánu vápenatého. V jedné další variantě provedení podle předloženého vynálezu se k eluátu popřípadě v kroku d) způsobu podle vynálezu přidá vodná suspenze obsahující 2 až 60 % hmotnostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště výhodně 20 až 40 % hmotnostních hydroxidu hořečnatého. Podle vynálezu je zahrnut také způsob, při kterém se k eluátu popřípadě v kroku d) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 25 % hmotnostních, s výhodou 10 až 20 % hmotnostních bázeického uhličitánu hořečnatého.

V eluátu nebo roztoku nebo suspenzi, obsahující D-pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý, které jsou získané z

kroků c) nebo d) způsobu podle předloženého vynálezu, se výše popsaným způsobem použitím aniontoměniče redukuje obsah jednomocných kationtů, výhodně amonných, draselných a/nebo sodných iontů, na koncentraci ≤ 1 g/kg eluátu nebo roztoku.

Sušení a/nebo formulace získaného roztoku nebo suspenze, obsahující D-pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý, se provádí o sobě známými způsoby, jako příkladně rozstříkovacím sušením, rozstříkovací granulací, sušením ve vířivé vrstvě, granulací ve vířivé vrstvě, sušením v bubnu nebo sušením spin-flash (Ullmann s Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6. vydání, 1999, elektronická forma, kapitola "Drying of Solid Materials"). Vstupní teplota plynu při konvekčním sušení je v rozmezí 100 až 280 °C, s výhodou 120 až 210 °C. Výstupní teplota plynu je v rozmezí 50 až 180 °C, s výhodou 60 až 150 °C. K nastavení požadované velikosti částic a s tím spojenými vlastnostmi produktu se mohou jemné částice oddělit a uvést zpět. Dále se mohou velké částice semlít v mlýně a následně rovněž zavádět zpět.

Podle vynálezu je výhodné při výše popsaném způsobu redukce nákladných zpracovatelských kroků, obzvláště se zřetelem na nepoužívání organických rozpouštědel při současné přípravě požadovaného produktu s dobrou biologickou bonitou. Dále se podle vynálezu podstatně snižuje množství vznikajících odpadních vod. Výsledkem jsou tak další úspory na nákladných čisticích a zneškodňovacích zařízeních. Tak se vyznačuje způsob podle předloženého vynálezu obzvláště tím, že je jednodušší, méně náchylný k poruchám, méně časově náročný, výrazně ekonomičtější a tím hospodárnější, než obvyklé dosavadní způsoby.

To však nevylučuje, aby se způsob podle vynálezu neobměňoval. Výše uvedené procesní kory a) až e) podle vynálezu se mohou doplnit jedním nebo několika následujícími procesními kroky, které jsou samy o sobě odborníkům známé. Zde jsou podle vynálezu zahrnuty všechny možné kombinace dodatečných procesních kroků s procesními kroky a) až e).

Tak se mohou roztoky nebo suspenze, získané z procesních kroků a) až d), zbavit zárodků zahřátím (sterilizací) nebo jinými metodami, jako je příkladně pasterizace nebo sterilní filtrace.

V dalších variantách způsobu podle předloženého vynálezu se může před sušením a/nebo formulací roztoku nebo suspenze provést nejméně jeden a/nebo kombinace následujících kroků, zahrnující lysi a/nebo usmrcení biomasy a/nebo oddělení biomasy od fermentačního roztoku a/nebo přidavek dalších přísad a/nebo koncentraci fermentačního roztoku, s výhodou odtažením vody.

Předmětem předloženého vynálezu je tak také způsob, kdy se lyse a/nebo usmrcení biomasy provádí ještě ve fermentačním roztoku nebo teprve po oddělení biomasy od fermentačního roztoku. To se může provádět příkladně tepelným ošetřením, s výhodou při teplotě 80 až 200 °C a/nebo okyselením, s výhodou kyselinou sírovou nebo kyselinou solnou a/nebo enzymaticky, s výhodou pomocí lysozymu.

V další formě provedení předloženého vynálezu se mohou buňky fermentačních mikroorganismů z roztoků nebo suspenzí v krocích a), c) nebo d) způsobu podle vynálezu oddělit filtrací, separací (příkladně odstředěním) a/nebo dekantováním. Možné je také uvádět roztok z kroku a) podle předlože-

ného vynálezu bez oddělení obsažených mikroorganismů přímo přes aniontoměnič.

Pokud kroku zpracování aniontoměničem (krok b)) způsobu podle předloženého vynálezu nepředchází oddělení biomasy, může se biomasu obsahující fermentační roztok výhodně vést také ze spodu vzhůru přes lože iontoměniče, tedy proti síle tíže.

Výsledný roztok ze zpracování aniontoměničem se může popřípadě návazně na neutralizaci koncentrovat na vhodné odparce, příkladně odparce se stékajícím filmem, odparce v tenké vrstvě nebo rotační odparce. Takovéto odparky vyrábí příkladně firmy GIG (4800 Attnang Puchheim, Rakousko), GEA Canzler (52303 Düren, Německo), Diessel (31103 Hildesheim, Německo) a Pitton (35274 Kirchhain, Německo).

Ke zlepšení barevných vlastností konečného produktu se může provést krok dodatečné filtrace, při kterém se k roztokům nebo suspenzím, získaným během procesu, přidá něco aktivního uhlí a tato suspenze se následně filtruje. Nebo se roztoky, získané během fermentace, mohou vést přes malé lože s aktivním uhlím. K tomu požadované množství aktivního uhlí je v rozmezí několika málo % hmotnostních roztoku a je na znalostech a uvážení odborníka.

Tyto filtrace se mohou usnadnit, jestliže se k danému roztoku nebo suspenzi před filtrací přidá obvyklý komerční flokulační pomocný prostředek (příkladně Sedipur CF 902 nebo Sedipur CL 930 firmy BASF AG, Ludwigshafen).

V jedné výhodné formě provedení předloženého vynálezu

se výsledný materiál fermentace (fermentační břečka) sterilizuje zahřátím a potom se zbaví buněčné hmoty odstředěním, filtrací nebo dekantací. Po přidavku 50 až 1000 mg/kg, s výhodou 100 až 200 mg/kg komerčně dodávaného flokulačního pomocného prostředku, vztaženo na výtěžek fermentace, se filtruje přes krátké lože aktivního uhlí a písku, aby se získal roztok s vysokým obsahem kyseliny D-pantothenové, zbavený biomasy. Následně se tento vyčištěný roztok vede přes lože iontoměniče.

Pokud kroku zpracování podle předloženého vynálezu přes aniontoměnič nepředchází oddělení biomasy, může se biomasu obsahující fermentační roztok výhodně vést také zespodu vzhůru přes lože iontoměniče, tedy proti síle tíže. Tento pracovní postup je v zásadě výhodný tehdy, když jsou v čištěném roztoku nebo suspenzi přítomné látky ve vzhledu.

Následné sušení roztoku nebo suspenze se může provádět příkladně rozstříkovacím sušením. To se může provádět v souproudu, protiproudu nebo ve smíšeném proudění. K rozprašení se mohou použít všechny známé rozprašovače, obzvláště odstředivé rozprašovače (rozprašovací disky), jednolátkové trysky nebo dvoulátkové trysky. Výhodné teplotní podmínky jsou 150 až 250 °C na vstupu do věže a 70 až 130 °C na výstupu z věže. Může se ale také sušit při vyšší nebo při nižší úrovni teploty. K dosažení velmi nízké zbytkové vlhkosti se ale může dodatečně provést další fáze sušení ve vířivém loži.

Rozstříkovací sušení se může provádět v sušárnách FSD nebo SBD (FSD : Fluidized Spray Dryer, SBD : Spray Bed Dryer), které vyrábí firma Niro (Kodaň, Dánsko) a APV-Anhydro (Kodaň, Dánsko), které představují kombinaci

rozstříkovací sušárny a vířivého lože.

Při rozstříkovacím sušení se může přidat pomocný prostředek ke zlepšení tekutosti. Tím se sníží tvorba povlaků na stěnách sušárny a zlepší se i chování při tečení, zejména u jemnozrnných prášků. Jako prostředky ke zlepšení tekutosti přicházejí v úvahu obzvláště silikáty, stearáty, fosfáty a kukuřičný škrob.

V zásadě se ale může sušení provádět také v nastříkované vířivé vrstvě, přičemž tato se může provozovat kontinuálně nebo diskontinuálně. Nastříkování roztoku se může provádět jak zeshora (Topspray), tak i zespoda (Bottomspray) nebo také ze strany (Sidespray).

Předmětem předloženého vynálezu je dále přípravek pro použití jako přísada do zvířecího krmiva a/nebo doplněk zvířecího krmiva, vyrobitelný tak, že

- a) se použije nejméně jeden organismus produkující kyselinu D-pantothenovou, jehož biosyntéza kyseliny pantothenové-(pan) a/nebo isoleucin/valin-(ilv) je deregulovaná a v kultivačním mediu se fermentací tvoří nejméně 2 g/l solí kyseliny D-pantothenové, přičemž se do kultivačního media uvádí 0 až 20 g/l, výhodně 0 g/l volného β -alaninu a/nebo solí β -alaninu,
- b) fermentační roztok obsahující D-pantothenát se vede přes aniontoměnič,
- c) na aniontoměniči vázaný D-pantothenát se eluuje roztokem obsahujícím anorganické nebo organické

25.08.03

vápenaté a/nebo hořečnaté soli ve formě D-pantothenátu vápenatého a/nebo hořečnatého nebo se eluuje roztokem kyseliny chlorovodíkové ve formě kyseliny D-pantothenové,

- d) popřípadě volná kyselina D-pantothenová, obsažená v roztoku, se přidavkem vápenaté a/nebo hořečnaté báze upraví na hodnotu pH 3 až 10, přičemž se získá roztok, který obsahuje kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát a
- e) eluát nebo roztok, obsahující kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát, se podrobí sušení a/nebo tvorbě formulace.

Při jedné variantě podle předloženého vynálezu se může v kroku c) použít eluční roztok, který obsahuje kyselé anorganické a/nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli a/nebo basické anorganické a/nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli.

V další variantě podle předloženého vynálezu se může v kroku d) nebo e) získat nebo předložit suspenze, která obsahuje pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý a po dalším zpracování se získá přípravek podle předloženého vynálezu.

Podle předloženého vynálezu se vyznačuje přípravek tím, že obsahuje soli kyseliny D-pantothenové v koncentraci alespoň 1 až 100 % hmotnostních, výhodně alespoň 20 až 100 % hmotnostních a obzvláště výhodně alespoň 50% hmotnostních. Předmětem předloženého vynálezu je přípravek, obsahující soli kyseliny D-pantothenové ve formě dvojmocných kationtů, výhodně jako D-pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý. Podle

předloženého vynálezu je výhodný přípravek, který se vyznačuje tím, že obsah solí kyseliny D-pantothenové ve formě jednomocných kationtů ≤ 1 g/kg.

Podle předloženého vynálezu se výše popsáním způsobem získá D-pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý, který vyhovuje požadavkům na přísady do krmiv. Těmito požadavky je příkladně relativně vysoký obsah D-pantothenátu a dobrá snášenlivost cílovým organismem a rovněž biologická bonita ve smyslu "vitaminový účinek" produktu podle vynálezu.

Předložený vynález bude blíže vysvětlen následujícími příklady, které však pro vynález nejsou limitující.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Do laboratorního fermentoru s míchadlem a plynovacím zařízením o obsahu 14 l se předloží vodné fermentační medium o následujícím složení :

Násada	Koncentrace (g/l)
Kvasnicový extrakt	10
Natriumglutamát	5
Síran amonný	8
dihydrogenfosforečnan K	6,7
hydrogenfosforečnan K	9,8

Po sterilizaci byly navíc přidány následující sterilní

komponenty media:

Násada	Koncentrace (g/l)
Glukoza	2,5
Síran vápenatý	0,1
Síran hořečnatý	1
Natriumcitrát	1
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,01
Roztok stopových solí	1 ml

Roztok stopových solí má následující složení :

0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2,5 g H_3BO_3 , 0,7 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 1,6 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 0,3 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, doplněno vodou na 1 l. Přídavek roztoku stopových solí se provádí po sterilizaci. Počáteční objem kapaliny činí 6 l. Výše uvedené obsahy jsou vztaženy na tuto hodnotu.

K tomuto roztoku se přidá 60 ml očkovací kultury (OD = 10) *Bacillus subtilis* PA 824 a za intenzivního míchání se fermentuje při teplotě 43 °C při plynování 12 l/min. Tento kmen se popisuje v příloze přihlášky PCT/US 0025993.

V průběhu 47 hodin se nadávkuje 6,5 l sterilního vodného roztoku, jehož složení je následující :

Násada	Koncentrace (g/l)
Glukoza	550
Síran vápenatý	0,7
Roztok stopových solí	6 ml

Fermentace se provádí s limitovanou glukozou. V průběhu fermentace se dávkováním 25 %-ního roztoku amoniaku případně 20 %-ní kyseliny fosforečné udržuje hodnota pH na 7,2. Amoniak zároveň slouží jako zdroj dusíku pro fermentaci. Počet otáček míchadla se reguluje, přičemž obsah rozpuštěného kyslíku se udržuje na hodnotě 30 % hodnoty při nasycení. Po přerušení dávkování zdroje uhlíku se fermentace vede dále tak dlouho, dokud obsah rozpuštěného kyslíku (pO_2) nedosáhne hodnoty 95 % při nasycení. Potom se fermentace ukončí a organismy se tepelně usmrtí. K tomu se fermentační roztok sterilizuje po dobu 45 minut. Usmrcení bylo prokázáno na deskách.

Následně se odstředěním provede oddělení buněk. Po oddělení buněk činí koncentrace D-pantothenátu po 48 hodinách 22,8 g/l.

Analogickým způsobem je také možné vyrobit fermentační břečky, které vykazují titr kyseliny pantothenové bez dokrmování β -alaninem více jak 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l.

1000 ml tohoto filtrátu se čerpá zespodu nahoru přes 250 ml skleněný sloupec, ve kterém se nachází asi 100 ml silně bázeického iontoměníče Lewatit MP 500 (v OH^- -formě). Průtok je zregulován na asi 20 ml/min. Potom se při stejném

průběhu čerpání proplachuje asi 1000 ml vody. Tento roztok obsahuje kationty ve formě iontů Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , K^+ a Na^+ . Potom se kyselina D-pantothenová, vázaná iontoměniči, eluuje asi 1000 ml 10% roztoku chloridu vápenatého. Eluát obsahuje kyselinu pantothenovou ve formě D-pantothenátu vápenatého a síranové a fosfátové ionty různých valencí.

75 ml vzorku takto získaného roztoku D-pantothenátu vápenatého se potom odpařením vody na rotační odparce usuší a získá se 4,8 g lehce nahnědlého práškovitého D-pantothenátu vápenatého, který má obsah 35 % D-pantothenátu vápenatého. Tento prášek nemá sklon ke tvoření slepenin a má dobré vlastnosti produktu.

P ř í k l a d 2

Do laboratorního fermentoru s míchadlem a plynovacím zařízením o obsahu 14 l se předloží vodné fermentační medium o následujícím složení :

Násada	Koncentrace (g/l)
Kvasnicový extrakt	10
Natriumglutamát	5
Síran amonný	8
KH_2PO_4	8,4
K_2HPO_4	15

Po sterilizaci byly navíc přidány následující sterilní komponenty media:

Násada	Koncentrace (g/l)
Glukoza	2,5
Chlorid vápenatý	0,1
Chlorid hořečnatý	1
Natriumcitrát	1
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,01
Roztok stopových solí	1 ml

Roztok stopových solí má následující složení :

0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2,5 g H_3BO_3 , 0,7 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 1,6 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 0,3 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, doplněno vodou na 1 l. Přídavek roztoku stopových solí se provádí po sterilizaci. Počáteční objem kapaliny činí 5,5 l. Výše uvedené obsahy jsou vztaženy na tuto hodnotu.

K tomuto roztoku se přidá 55 ml očkovací kultury (OD = 10) *Bacillus subtilis* PA 824 a za intenzivního míchání se fermentuje při teplotě 43 °C při plynování 12 l/min. Tento kmen se popisuje v příloze přihlášky PCT/US 0025993.

V průběhu 48 hodin se nadávkuje 6 l sterilního vodného roztoku. Složení je následující :

Násada	Koncentrace (g/l)
Glukoza	550
Chlorid vápenatý	0,6
Roztok stopových solí	6 ml/l

Fermentace se provádí s limitovanou glukozou. V průběhu fermentace se dávkováním 25 %-ního roztoku amoniaku případně 20 %-ní kyseliny fosforečné udržuje hodnota pH na 7,2. Amoniak zároveň slouží jako zdroj dusíku pro fermentaci. Počet otáček míchadla se reguluje, přičemž obsah rozpuštěného kyslíku se udržuje na hodnotě 30 % hodnoty při nasycení. Po přerušení dávkování zdroje uhlíku se fermentace vede dále tak dlouho, dokud obsah rozpuštěného kyslíku (pO_2) nedosáhne hodnoty 95 % při nasycení. Potom se fermentace ukončí a organismy se tepelně usmrtí. K tomu se fermentační roztok sterilizuje po dobu 30 minut. Usmrcení bylo prokázáno na deskách.

Následně se odstředěním provede oddělení buněk. Po oddělení buněk činí koncentrace D-pantothenátu po 48 hodinách 24,1 g/l.

Analogickým způsobem je také možné vyrobit fermentační břečky, které vykazují titr kyseliny pantothenové bez dokrmování β -alaninem více jak 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l.

1300 ml produktu z fermentoru se nanese na lože (objem asi 1 litr) iontoměniče Lewatitu MP 500 (v Cl^- -formě) a promývá se asi 1 l vody. Průtok se reguluje asi na 20 ml/min.

25.08.03

Za stejného nastavení průtoku ce přes iontoměnič přečerpají 2 l 5% suspenze vápenného mléka. Eluuje se takto roztok s obsahem D-pantothenátu vápenatého 28 g/l. Kationty ve formě amonných, draselných, hořečnatých nebo sodných iontů nejsou detekovány. Koncentrace fosforečnanových iontů je redukována o 20 % ve srovnání s výchozím roztokem před iontoměničem.

Vodný roztok D-pantothenátu vápenatého se usuší v laboratorní rozstřikovací sušárně firmy Niro, typ Minor. Teplota na vstupu do věže činí asi 200 °C, teplota na výstupu z věže je 85 až 90 °C. Rozprášení se provádí pomocí dvoudruhovité trysky při tlaku 0,4 MPa.

Získá se přitom práškovitý produkt o následující specifikaci (údaje jsou v % hmotnostních) :

Obsah vody :	2 %
D-pantothenát vápenatý :	56,3 %
Amoniové ionty :	< 0,01 %
Draselné ionty :	< 0,01 %
Sodné ionty :	< 0,01 %
Hořečnaté ionty :	< 0,01 %.

P ř í k l a d 3

Do laboratorního fermentoru s míchadlem a plynovacím zařízením o obsahu 300 l se předloží vodné fermentační medium o následujícím složení :

Násada	Koncentrace (g/l)
sojová moučka	40
Kvasnicový extrakt	5
Natriumglutamát	5
Síran amonný	8
KH_2PO_4	10
K_2HPO_4	20

Po sterilizaci byly navíc přidány následující sterilní komponenty media:

Násada	Koncentrace (g/l)
Glukoza	2,5
Síran vápenatý	0,1
Síran hořečnatý	1
Natriumcitrát	1
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,01
Roztok stopových solí	1 ml

Roztok stopových solí má následující složení :

0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2,5 g H_3BO_3 , 0,7 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 1,6 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 0,3 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, doplněno vodou na 1 l. Přídavek roztoku stopových solí se provádí po sterilní filtraci. Počáteční objem kapaliny činí 100 l. Výše uvedené obsahy jsou vztaženy na tuto

hodnotu.

K tomuto roztoku se přidají 4 l očkovací kultury (OD = 10) *Bacillus subtilis* PA 824 a za intenzivního míchání se fermentuje při teplotě 43 °C při plynování 1,8 m³/h. Tento kmen se popisuje v příloze přihlášky PCT/US 0025993.

V průběhu 43 hodin se nadávkuje 113 l sterilního vodného roztoku. Složení je následující :

Násada	Koncentrace (g/l)
Glukoza	550
Chlorid vápenatý	0,6
Natriumcitrát	2
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,02
Natriumglutamát	5
Roztok stopových solí	1 ml

Fermentace se provádí s limitovanou glukozou. V průběhu fermentace se dávkováním 25 %-ního roztoku amoniaku případně 20 %-ní kyseliny fosforečné udržuje hodnota pH na 7,2. Amoniak zároveň slouží jako zdroj dusíku pro fermentaci. Počet otáček míchadla se reguluje, přičemž obsah rozpuštěného kyslíku se udržuje na hodnotě 30 % hodnoty při nasycení. Po přerušení dávkování zdroje uhlíku se fermentace vede dále tak dlouho, dokud obsah rozpuštěného kyslíku (pO₂) nedosáhne hodnoty 95 % při nasycení. Po 43 hodinách se fermentace ukončí. Oddělení buněk se provede separací na talířové odstředivce. Potom se fermentační roztok, prostý buněk, sterilizuje po dobu 60 minut. Usmrcení bylo prokázá-

no na deskách.

Koncentrace D-pantothenátu po oddělení buněk činí 21 g/l. Analogickým způsobem je také možné vyrobit fermentační břečky, které vykazují titr kyseliny pantothenové bez dokrmování β -alaninem více jak 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l. Fermentační roztok se prefiltruje.

Z takto získaného filtrátu se 1800 ml nanese na lože (objem 1 litr) iontoměniče Lewatitu MP 500 (v OH-formě) a promývá se vodou. Průtok činí asi 20 ml/min.

Se stejnou hodnotou průtoku se přes iontoměnič vedou asi 2 litry asi 8% roztoku kyseliny chlorovodíkové. Eluát se shromáždí a přidavkem vodné 20% disperze hydroxidu vápenatého (vápenné mléko) se hodnota pH upraví na hodnotu přibližně 7. Ještě jednou se prefiltruje přes papírový filtr a jako filtrát se získá 2174 g vodného roztoku D-pantothenátu vápenatého s obsahem 21 g/l D-pantothenátu vápenatého.

Vodný roztok nebo suspenze D-pantothenátu vápenatého se usuší v laboratorní rozstříkovací sušárně firmy Niro, typ Minor. Teplota na vstupu do věže činí asi 185 °C, teplota na výstupu z věže je asi 95 °C. Rozprášení se provádí pomocí dvoudruhové trysky při tlaku 0,2 MPa. Získá se přitom práškovitý produkt o následující specifikaci (údaje jsou v % hmotnostních) :

Obsah vody :	1,4 %
D-pantothenát vápenatý :	52,2 %
Amoniové ionty :	< 0,01 %

Draselné ionty : < 0,01 %
Sodné ionty : < 0,01 %
Hořečnaté ionty : < 0,01 %

P ř í k l a d 4

V laboratorním fermentoru s míchadlem a plynovacím zařízením o obsahu 20 l se smíchá 200 g sojové moučky, 50 g 50 %-ního kvasnicového extraktu, 25 g glutamátu sodného, 40 g síranu amonného a 5 ml prostředku proti pění Tego KS911 se 3,9 l vody a sterilizuje po dobu 30 minut při teplotě 121 °C.

Následně se přidá roztok 1, 2, 3 a roztok 4.

Roztok 1 se připraví následovně :

87,5 g glukózy, 0,5 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ a 5 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 500 ml vody a sterilně se přefiltruje.

Roztok 2 se připraví následovně :

25 ml roztoku citrátu železnatého (200 g/l citrátu sodného, 2 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, sterilně filtrováno) se smíchá s 5 ml roztoku stopových solí (0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g H_3BO_3 , 0,7 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 1,6 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, doplněno vodou na 1 l, sterilně filtrováno).

Roztok 3 se připraví následovně :

12,5 g glukózy se doplní vodou na 100 ml a sterilizuje se.

Roztok 4 se připraví následovně :

25 g KH_2PO_4 , 50 g K_2HPO_4 , 25 g NaH_2PO_4 a 50 g Na_2HPO_4 se doplní vodou na 500 ml a sterilizuje se.

25.08.03

Do smíšeného media (objem po přidavku všech roztoků činí 5 l) se přidá 100 ml očkovací kultury (v mediu SVY (SVY medium : 25 g Difco Veal Infusion Broth, 5 g Difco Yeast Extract, 5 g glutamátu sodného, 2,7 g síranu amonného se rozpustí v 740 ml vody, sterilizuje se, následně se přidá 200 ml sterilního 1 M K_2HPO_4 (pH 7,0) a 60 ml 50 %-ního sterilního roztoku glukózy (konečný objem 1 l)) *Bacillus subtilis* PA 668-2A a za intenzivního míchání se fermentuje při teplotě 43 °C za silného míchání při plynování 12 m³/min. Tento kmen se popisuje v příloze přihlášky US-Serial-Nr. 60/262995.

V průběhu 48 hodin se nadávkuje asi 3,5 l sterilního vodného roztoku glukózy. Roztok se připraví následovně : 5 kg glukózy x H₂O a 3,6 g chloridu vápenatého x 2 H₂O se smíchá s 2,1 kg vody a sterilizuje se po dobu 30 minut. Následně se přidá 11 ml roztoku stopových solí (složení viz výše) a rovněž 55 ml roztoku citrátu železnatého (složení viz výše). Následně se přidá 73 ml sterilně filtrovaného roztoku 375 g/l glutamátu sodného.

Fermentace se provádí s limitovanou glukózou. V průběhu fermentace se dávkováním 25 %-ního roztoku amoniaku případně 20 %-ní kyseliny fosforečné udržuje hodnota pH na 7,2. Amoniak zároveň slouží jako zdroj dusíku pro fermentaci. Počet otáček míchadla se reguluje, přičemž obsah rozpustěného kyslíku se udržuje na hodnotě 20 % hodnoty při nasycení. Tvorba pěny se řídí občasným nadávkováním prostředku proti pění Tego KS 911. Po přerušení dávkování zdroje uhlíku se fermentace vede dále tak dlouho, dokud obsah rozpustěného kyslíku (pO₂) nedosáhne hodnoty 95 % při nasycení. Potom se fermentace ukončí. Oddělení buněk se provede

25.08.03

odstředěním. Zbývající buňky se usmrtí termicky sterilizací. Po separaci a sterilizaci je koncentrace D-pantothenátu 29,6 g/l. Analogickým způsobem je také možné vyrobit fermentační břečky, které vykazují titr kyseliny pantothenové bez dokrmování β -alaninu více jak 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a více jak 90 g/l.

P ř í k l a d 5

700 ml fermentační kapaliny z příkladu 4 se čerpá sdola nahoru skleněným sloupcem o objemu 1,4, naplněným asi 1000 ml silně bázičského iontoměniče Lewatitu MP 500 (v OH^+ -formě), přičemž průtok se při tom zreguluje na asi 20 ml/min. Potom se při stejné hodnotě průtoku promývá asi 2000 ml vody. Roztok obsahuje kationty ve formě amonných, vápenatých, draselných, hořečnatých a sodných iontů. Potom se kyselina pantothenová, vázaná na iontoměniči, eluuje asi 2000 ml 5% roztoku chloridu sodného. Eluát obsahuje kyselinu pantothenovou ve formě D-pantothenátu vápenatého, chloridové, sulfátové a fosfátové ionty různých valencí.

Vodný roztok D-pantothenátu vápenatého se usuší v laboratorní rozstřikovací sušárně firmy Niro, typ Minor. Teplota na vstupu do věže činí asi 200 °C, teplota na výstupu z věže je 85 až 90 °C. Rozprášení se provádí pomocí dvoudruhé trysky při tlaku 0,4 MPa. Rozprašovací přípravek se nepřidává. Získá se přitom práškovitý produkt o následující specifikaci (údaje jsou v % hmotnostních) :

Obsah vody :	2 %
D-pantothenát :	24 %
Amoniové ionty :	0,05 %
Draselné ionty :	0,09 %

Sodné ionty : 0,02 %
Hořečnaté ionty : < 0,01 % .

P ř í k l a d 6

1000 ml fermentačního roztoku, získaného v příkladě 4, se nanese na lože (objem asi 1 litr) iontoměniče Lewatitu MP 500 (v Cl^- -formě) a promývá se asi 2000 ml vody. Průtok činí asi 20 ml/min. Při stejné hodnotě průtoku se přes iontoměnič vedou 2 l 10% roztoku chloridu vápenatého. Eluuje se při tom roztok, obsahující D-pantothenát v množství 11 g/l. Kationty ve formě iontů amonných, draselných, hořečnatých nebo sodných nejsou detekovány. Koncentrace fosfátových iontů byla ve srovnání s výchozím roztokem před iontoměničem zredukována na 7,7 % .

75 ml vzorek takto získaného roztoku D-pantothenátu vápenatého se potom odpařením vody na rotační odparce usuší a získá se takto 3,3 g lehce nahnědlého práškovitého D-pantothenátu vápenatého, který má obsah 25 % hmotnostních D-pantothenátu. Tento práškovitý produkt nemá sklon ke tvorbě slepenin a má dobré vlastnosti produktu.

P ř í k l a d 7

Z filtrátu, získaného v příkladě 4 se 1500 ml nanese na lože (objem asi 1 litr) iontoměniče Lewatitu MP 500 (v OH^- -formě) a promývá se asi 2000 ml vody. Průtok činí asi 20 ml/min. Při stejné hodnotě průtoku se přes iontoměnič vedou 2 l 5% roztoku kyseliny chlorovodíkové.

Eluát se shromáždí a hodnota pH se pomocí 20% vápeného mléka (rozmíchaný hydroxid vápenatý ve vodě) nastaví na

25.08.03

přibližně 7. Potom se ještě jednou filtruje přes papírový filtr a jako filtrát se získá vodný roztok D-pantothenátu vápenatého s obsahem D-pantothenátu 19 g/l.

Vzorek 75 ml z akto získaného roztoku D-pantothenátu vápenatého se potom odpařením vody na rotační odparce usuší a získá se takto 5,7 g lehce nahnědlého práškovitého D-pantothenátu vápenatého, který má obsah 25 % hmotnostních D-pantothenátu. Tento práškovitý produkt nemá sklon ke tvorbě slepenin a má dobré vlastnosti produktu.

P ř í k l a d 8

Z filtrátu, získaného v příkladě 4 se 1500 ml nanese na lože (objem asi 1 litr) iontoměniče Lewatitu MP 500 (v OH^- -formě) a promývá se asi 2000 ml vody. Průtok činí asi 20 ml/min.

Při stejné hodnotě průtoku se přes iontoměnič vedou 2 l asi 4% suspenze hydroxidu vápenatého. Eluát se shromáždí a hodnota pH se upraví na přibližně 7. Takto se získá vodný roztok D-pantothenátu vápenatého s obsahem D-pantothenátu 21 g/l.

Vzorek 75 ml z akto získaného roztoku D-pantothenátu vápenatého se potom odpařením vody na rotační odparce usuší a získá se takto 5,6 g lehce nahnědlého práškovitého D-pantothenátu vápenatého, který má obsah 28 % hmotnostních D-pantothenátu. Tento práškovitý produkt nemá sklon ke tvorbě slepenin a má dobré vlastnosti produktu.

ADVOKÁT
ADVOKÁT
100 00 PRAHA 2, Látková 2

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí,

v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e

- a) se použije nejméně jeden organismus produkující kyselinu D-pantothenovou, jehož biosyntéza kyseliny pantothenové-(pan) a/nebo isoleucin/valin-(ilv) je deregulovaná a v kultivačním mediu se fermentací tvoří nejméně 2 g/l solí kyseliny D-pantothenové, přičemž se do kultivačního media uvádí 0 až 20 g/l volného β -alaninu a/nebo solí β -alaninu,
- b) fermentační roztok obsahující D-pantothenát se vede přes aniontoměnič,
- c) na aniontoměniči vázaný D-pantothenát se eluuje roztokem obsahujícím anorganické nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli ve formě D-pantothenátu vápenatého a/nebo hořečnatého nebo se eluuje roztokem kyseliny chlorovodíkové ve formě kyseliny D-pantothenové,
- d) popřípadě volná kyselina D-pantothenová, obsažená v roztoku, se přidavkem vápenaté a/nebo hořečnaté báze upraví na hodnotu pH 3 až 10, přičemž se získá roztok, který obsahuje kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát a
- e) eluát nebo roztok, obsahující kalciumpantothenát

25.03.03

a/nebo magnesiumpantothénát se podrobí sušení
a/nebo tvorbě formulace.

2. Způsob podle nároku 1 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se do kultivačního
media nepřidává volný β -alanin a/nebo sůl β -alaninu.
3. Způsob podle některého z nároků 1 nebo 2,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako organismy
produkující kyselinu D-pantothénovou použijí bakterie,
kvasinky nebo houby.
4. Způsob podle některého z nároků 1 až 3,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jako
mikroorganismus použijí bakterie rodu Bacillaceae.
5. Způsob podle některého z nároků 1 až 4,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se použije bakterie
rodu Bacillus a s výhodou druhu B. subtilis, B. licheniformis
nebo B. amyloliquefaciens.
6. Způsob podle některého z nároků 1 až 5,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se v kroku a) tvoří
množství kyseliny pantothénové a/nebo jejích solí nejméně
10 g/l kultivačního media, s výhodou nejméně 20 g/l kultivačního
media, obzvláště výhodně nejméně 40 g/l kultivačního
media a zcela obzvláště výhodně nejméně 60 g/l kultivačního
media.
7. Způsob podle některého z nároků 1 až 6,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že je v kroku b)
redukován obsah jednomocných kationtů, výhodně iontů
amonných, draselných a/ebó sodných, na koncentraci $\leq 1\text{g/kg}$
roztoku.

8. Způsob podle některého z nároků 1 až 7 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že eluční roztok
v kroku c) obsahuje kyselé anorganické a/nebo organické
vápenaté a/nebo hořečnaté soli a/nebo basické anorganické
a/nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli.
9. Způsob podle některého z nároků 1 až 8 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se v kroku c) po-
užije jako anorganická sůl halogenid vápníku a/nebo hořčíku,
výhodně chlorid vápenatý a/nebo chlorid hořečnatý.
10. Způsob podle některého z nároků 1 až 9 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se v kroku c) po-
užije jako anorganická base hydroxid vápenatý, uhličitan
vápenatý, oxid vápenatý, hydroxid hořečnatý nebo uhličitan
hořečnatý.
11. Způsob podle některého z nároků 1 až 10 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se v kroku c) po-
užije jako organická sůl vápníku a/nebo hořčíku mravenčan,
octan, propionát, glycinát a/nebo laktát vápníku a/nebo
hořčíku.
12. Způsob podle některého z nároků 1 až 11 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se v kroku d) upraví
pH roztoku na hodnotu 5 až 10.
13. Způsob podle některého z nároků 1 až 12,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se v kroku d) upraví
pH roztoku na hodnotu 5 až 9, s výhodou 6 až 9 a obzvláště
výhodně na 6 až 8.

14. Způsob podle některého z nároků 1 až 13,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do roztoku
v kroku d) přidá k neutralizaci hydroxid vápenatý, uhličitan
vápenatý, oxid vápenatý, hydroxid hořečnatý a/nebo bázeický
uhličitan hořečnatý ve formě pevné látky a/nebo vodné
suspenze.

15. Způsob podle některého z nároků 1 až 14,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do roztoku
v kroku d) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 55 % hmot-
nostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště
výhodně 20 až 40 % hmotnostních hydroxidu vápenatého.

16. Způsob podle některého z nároků 1 až 15,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do roztoku
v kroku d) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 65 % hmot-
nostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště
výhodně 20 až 40 % hmotnostních uhličitanu vápenatého.

17. Způsob podle některého z nároků 1 až 16,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do roztoku
v kroku d) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 60 % hmot-
nostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště
výhodně 20 až 40 % hmotnostních hydroxidu hořečnatého.

18. Způsob podle některého z nároků 1 až 17,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do roztoku
v kroku d) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 25 % hmot-
nostních, s výhodou 10 až 20 % hmotnostních, bázeického
uhličitanu hořečnatého.

19. Způsob podle některého z nároků 1 až 18,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se v kroku d) nebo
e) získá nebo předloží suspenze, obsahující pantothénát

vápenatý a/nebo pantothenát hořečnatý.

20. Přípravek pro použití jako přísada do zvířecího krmiva a/nebo doplněk zvířecího krmiva,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že je vyrobitelný tak,
že

- a) se použije nejméně jeden organismus produkující kyseliny D-pantothenovou, jehož biosyntéza kyseliny pantothenové-(pan) a/nebo isoleucin/valin-(ilv) je deregulovaná a v kultivačním mediu se fermentací tvoří nejméně 2 g/l solí kyseliny D-pantothenové, přičemž se do kultivačního media uvádí 0 až 20 g/l volného β -alaninu a/nebo solí β -alaninu,
- b) fermentační roztok obsahující D-pantothenát se vede přes aniontoměnič,
- c) na aniontoměniči vázaný D-pantothenát se eluuje roztokem obsahujícím anorganické nebo organické vápenaté a/nebo hořečnaté soli ve formě D-pantothenátu vápenatého a/nebo hořečnatého nebo se eluuje roztokem kyseliny chlorovodíkové ve formě kyseliny D-pantothenové,
- d) popřípadě volná kyselina D-pantothenová, obsažená v roztoku, se přidavkem vápenaté a/nebo hořečnaté báze upraví na hodnotu pH 3 až 10, přičemž se získá roztok, který obsahuje kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát a
- e) eluát nebo roztok, obsahující kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát se podrobí sušení

a/nebo tvorbě formulace.

21. Přípravek podle nároku 20 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se v kroku c) po-
užije eluční roztok, který obsahuje anorganickou a/nebo
organickou vápenatou a/nebo hořečnatou sůl a/nebo bázickou
anorganickou a/nebo organickou vápenatou a/nebo hořečnatou
sůl.
22. Přípravek podle některého z nároků 20 nebo 21 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se v kroku c) nebo
d) získá nebo předloží suspenze, obsahující pantothenát vá-
penatý a/nebo hořečnatý.
23. Přípravek podle některého z nároků 20 až 22 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje soli kyse-
liny D-pantothenové ve formě dvojmocných kationtů, s výhodou
D-pantothenát vápenatý a/nebo hořečnatý.
24. Přípravek podle některého z nároků 20 až 23 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje soli
kyseliny D-pantothenové o koncentraci nejméně 1 až 100 %
hmotnostních, s výhodou nejméně 20 až 100 % hmotnostních
a obzvláště výhodně nejméně 50 % hmotnostních.
25. Přípravek podle některého z nároků 20 až 24 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsah solí kyseliny
D-pantothenové ve formě jednomocných kationtů je ≤ 1 g/kg.