

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2003 - 2223**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.02.2002**

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

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/10108223**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003**  
(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP02/01766**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/066666**

(13) Druh dokumentu: **A3**

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

**C 12 P 13/02**

**A 23 K 1/00**

(71) Přihlašovatel:

**BASF AKTIENGESELLSCHAFT, Ludwigshafen, DE;**

(72) Původce:

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) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

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

(57) Anotace:

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

MINISTERSTVO VĚSTNÍČNÍKŮ  
ČESKÉ REPUBLIKY  
VĚSTNÍK PRÁVNÍ ÚŘADNÍ

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

### Oblast techniky

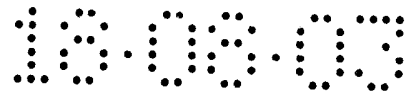
Předložený vynález se týká zlepšeného způsobu výroby kyseliny D-pantothenové a/nebo jejích solí a použití jako přísady do zvířecích krmiv.

### 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-pantolaktou a kalcium- $\beta$ -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 enantiomery) 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 předstupu kyseliny pantothenové,  $\beta$ -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  $\beta$ -alaninem. Fermentační roztok se k oddělení bihmoty 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 přítomnosti 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 rozstříkovaním. 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  $\beta$ -alaninu výrazně redukuje nebo dokonce není nutné. Dále je žádoucí výroba kyseliny D-pantothenové ve formě jejích dvojsytných

solí a zde především solí kovů alkalických zemin, protože dvojsytné soli mají méně hygroskopické vlastnosti než jednosytné soli kyseliny D-pantothenové a pro další použití, příkladně jako doplněk zvířecího krmiva tak mají méně výrazný 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 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  $\beta$ -alaninu a/nebo solí  $\beta$ -alaninu
- b) fermentační roztok obsahující D-pantothenát se uvádí vytvořením elektrického pole přes jednu nebo několik iontoselektivních membrán, přičemž se z roztoku obsahujícího D-pantothenát odstraní nízkomolekulární ionty,
- c) volná kyselina D-pantothenová obsažená v roztoku se přidávkem vápenaté a/nebo hořečnaté báze upraví na hodnotu pH 5 až 10, přičemž se získá roztok, který obsahuje kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantot-

henát a

- d) roztok obsahující kalciumpantothénát a/nebo magnesiumpantothénát se podrobí sušení a/nebo tvorbě formulace.

Při jedné variantě způsobu podle vynálezu se v kroku c) nebo d) získá nebo předloží suspenze, která obsahuje kalciumpantothénát a/nebo magnesiumpantothénát.

Dále se může fermentace podle vynálezu probíhající v kroku a) 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 pa-

sivně známými mechanismy.

Podle vynálezu se jako mikroorganismy 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 *Actinomyces*. 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 klíčových pozicích relevantních cest biosyntézy při látkové výměně použitého organismu.

Možné je také použití transgeních organismů, které rezultují 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-valin, 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 aspartát- $\alpha$ -dekarboxylázy (panD), příkladně přeexpresí a/nebo deregulací.

Termínem "deregulace" se podle vynálezu rozumí násle-

dující : 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 endogenního 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, enhancem, transkripcionálních 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 celulární dostupnost kofaktorů (příkladně methylen-tetrahydrofolát, redox-ekvivalenty a jiné) v množství optimálním pro produkci kyseliny pantothenové.

S výhodou je dostupný  $\beta$ -alanin již v buňkách ve zvýšené koncentraci oproti 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 isoleucin-valin-(ilv)-a/nebo asparát- $\alpha$ -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 druhích Bacillus) je zcela 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 aktivi-

tu, to znamená, že enzymatická aktivita *coaA* není zcela potlačena. Vedle přeexprese 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* ( $\text{Trp}^-$ ), ze kterého se transdukcí  $\text{Trp}^+$  markeru (z *Bacillus subtilis* divoký typ W 23) vyrobí kmen PY 79. Do kmenu 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  $P_{26\text{panBCD}}$ , *trpC2* ( $\text{Trp}^-$ )) a genomickou DNA kmene *Bacillus subtilis* PA 303 (genotyp  $P_{26\text{panE1}}$ ). Výsledný kmen PA 327 má genotyp  $P_{26\text{panBCD}}$ ,  $P_{26\text{panE1}}$  a je tryptofaně auxotrofní ( $\text{Trp}^-$ ). Se kmenem *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  $\beta$ -alaninu a 5 g/l  $\alpha$ -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 sekvenčních 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 uměle vytvořeným 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  $\beta$ -alaninu a 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovalerátu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 0,92 g/l (24 hodin).

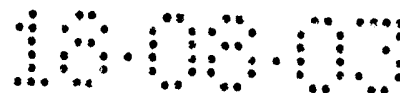
Výroba kmene *Bacillus subtilis* PA 303 (genotyp  $P_{26}$ panE1) se popisuje v následujícím odstavci : S pomocí genové sekvence *E. coli* panE se analogicky klonuje sekvence *Bacillus* panE. Ukazuje se, že v *Bacillus subtilis*

existují dva homology genu panE E.coli, které se označují jako panE1 a panE2. Deleční analyzou 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 nahražen promotor silněji konstitutivním promotorem P<sub>26</sub> a místo napojení ribosomu před genem panE1 se nahradí artificiálním místem vazby. Fragment P<sub>26</sub>panE1 se klonuje do vektoru, který je vytvořen tak, aby fragment P<sub>26</sub>panE1 se mohl integrovat do originální pozice panE1 v genu Bacillus subtilis. Po transformaci a homologické rekombinaci se výsledný kmen jmenuje PA 303 a má genotyp P<sub>26</sub>panE1. Se kmenem Bacillus subtilis PA 303 se 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 1,66 g/l (24 hodin).

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

Se kmenem Bacillus subtilis PA 340 se v 10 ml kultury s mediem 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<sub>26</sub> 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  $trpC2$  ( $Trp^-$ ).

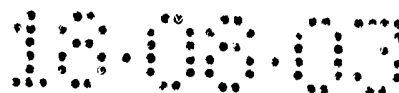
Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 374 v 10 ml kultury s médiem SVY, které se doplní pouze 5 g/l  $\beta$ -alaninu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 2,99 g/l (24 hodin).

Aby bylo možné s kmenem PA 374 produkovat kyselinu pantothenovou bez dokrmování  $\beta$ -alaninu, byly do kmene PA 374 zavedeny dodatečné kopie genu  $panD$  kodující pro aspartát- $\alpha$ -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 médiem 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 :  
*Bacillus subtilis*  $panD$  se klonuje  $panBCD$  operonu do vektoru, který nese tetracyklinový markerový gen. Před  $panD$  se klonuje promotor  $P_{26}$  a výše popsáná artificiální RBS. Restričním trávením se vyrobí fragment, který obsahuje tetracyklinový markerový gen a a gen  $P_{26}panD$ . Tento fragment se religuje a transformuje do výše popsáného kmene PA 221. Přitom fragment integruje do genomu kmene PA 221. Výsledný kmen PA 401 má genotyp  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panD$ ,  $tetR$  a  $trpC2$  ( $Trp^-$ ).

Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 401 se v 10 ml kultury s médiem SVY, které se doplní 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovalerátu dosáhne



titru kyseliny pantothenové až 0,3 g/l (24 hodin). V 10 ml kultury s mediem SVY, které se doplní 5 g/l kyseliny D-pantoiové a 10 g/l L-aspartátu se dosáhne titru kyseliny pantothenové až 2,2 g/l (24 hodin).

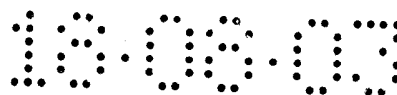
S výchozím kmenem PA 377 se transformací s chromosomální DNA kmene PY 79 generuje tryptofan-prototrofní kmen. Tento kmen PA 824 má genotyp  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  $P_{26}ilvBNC$ ,  $P_{26}ilvD$ ,  $specR$ ,  $tetR$  a  $trp^+$ . Se kmenem *Bacillus subtilis* PA 824 v 10 ml kultury s mediem 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.

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 restričním 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 mediem 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 mediem 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l natriumcitrátu, 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  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,7 g  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l 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, Erfurtstadt), 10 g/l Na-glutamátu, 4 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l 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, prodloužením 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  $\beta$ -alanin nebo L-aspartát a/nebo L-valin a/nebo  $\alpha$ -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  $\beta$ -alanin a/nebo soli  $\beta$ -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  $\beta$ -alaninu a/nebo solí  $\beta$ -alaninu. Nezávislost na dokrmování výchozích látek představuje obzvláště významnou ekonomickou výhodu způsobu podle vynálezu oproti známým způsobům, neboť řada výchozích látek je velmi drahá.

Přídavek  $\beta$ -alaninu a/nebo solí  $\beta$ -alaninu však není podle vynálezu vyloučen, takže se může následně výtěžek kyseliny D-pantothenové přídavkem  $\beta$ -alaninu a/nebo solí  $\beta$ -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 % přídavkem volného  $\beta$ -alaninu a/nebo solí  $\beta$ -alaninu.

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

nímu 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 pění dochází ke kultivaci organismu. Případně nutná regulace pH hodnoty media se může provádět různými anorganickými nebo organickými louhy nebo kyselinami, jako je například NaOH, KOH, amoniak, kyselina fosforečná, kyselina sírová, kyselina solná, kyselina mravenčí, kyselina jantarová, kyselina citronová a podobně.

Na základě pufovacích systémů použitých během fermentace, které mohou být, jak bylo výše popsáno příkladně NaOH, KOH, amoniak, kyselina fosforečná, kyselina sírová, kyselina solná, kyselina mravenčí, kyselina jantarová, kyselina citronová a podobně, je vytvořená kyselina pantothenová ve fermentačním roztoku podle použitého pufovacího 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 procesem elektro-membránové separace.

Předložený vynález přitom zahrnuje všechny dostupné druhy elektromembránových separačních procesů, jako je membránová elektrolýza nebo elektrodialýza. Provedení vhodného výběru patří ke znalostem odborníka.

Podle vynálezu výhodné je použití elektrodialýzy. Přitom se použije jak elektrodialýza s výhradně monopolárními membránami, tak i elektrodialýza s mono- a/nebo bipolárními membránami. Obzvláště výhodná je elektrodialýza s výhradně monopolárními membránami, obzvláště elektrodialýza s monopolárními membránami selektivními pro jednomocné ionty, tak zvanými monoselektivními membránami.

V zásadě se k provedení způsobu podle vynálezu mohou použít libovolné, obvykle v rámci elektrodialyzových procesů používané membrány. V případě membrán použitých v rámci elektrodialyzových procesů podle vynálezu se s výhodou použijí běžně komerčně dodávané iontoměničové membrány.

Jako použitelné iontoměničové membrány je možné příkladně jmenovat :  
Neosepta AM1, AM2, AM3, AMX, AMH, AFN firmy Tokuyama Corp.  
a AMV firmy Asahi Glass.

Jako kationtoměničové membrány je možné příkladně jmenovat :  
Neosepta CM1, CM2, CMX, CMH, CMB, Asahi Glass CMV a rovněž  
Naflon 435 nebo 350 firmy Du Pont de Nemours.

Jako monoselektivní kationtoměničové membrány lze příkladně jmenovat membránu Neosepta CMS.

Jako monoselektivní aniontoměničové membrány

přicházejí v úvahu membrány Neosepta ACS firmy Tokuyama Corp., nebo Selmion ASV firmy Asahi Glass.

Jako elektrody se mohou použít nerezavějící oceli, nikl, drahé kovy, nebo jiné vhodné materiály, které jsou odborníkům známé.

Použitím monopolární elektrodialýzy se podle vynálezu mohou jak anionty tak i kationty z roztoku obsahujícího pantothenát převést migrací aniontoměničovou případně kationtoměničovou membránou v elektrickém poli převést do druhého roztoku (roztok koncentrátu, KONZ) a tak je odstranit z roztoku obsahujícího kyselinu pantothenovou (roztok diluátu, DIL). S výhodou se podle vynálezu odstraní z roztoku obsahujícího kyselinu pantothenovou nízkomolekulární ionty. Jako nízkomolekulární ionty se podle vynálezu rozumí takové ionty, které jsou do fermentační břečky vnášeny složením kultivačního media a/nebo pufrovacího systému, v konečném produktu jsou však nežádoucí. Příkladně se přitom jedná o následující ionty : amoniový, draselný, sodný, ionty železa, chloridové ionty, fosfátové nebo síranové ionty.

V jedné další variantě provedení předloženého vynálezu je možné provést výměnu jednomocných kationtů, jako jsou sodné nebo amoniové ionty, za vícemocné kationty, jako je vápenatý kation. K tomu se pro jednosytné ionty použijí selektivní kationtoměničové membrány. Tak se příkladně do okruhu I předloží roztok  $\text{CaCl}_2$  a do druhého okruhu II, odděleného od okruhu I kationtoměničovou membránou, se předloží roztok kyseliny pantothenové obsahující jednomocné kationty. Do třetí komory III se potom převedou kationtoměničovou membránou selektivní pro jednomocné ionty a umístě-

nou mezi komorou II a komorou III, s výhodou jednomocné kationty. Zároveň se do komory I z komory III převedou aniontoměničovou membránou umístěnou mezi komorou I a komorou II anionty, jako chloridové ionty. Vápenaté ionty se z komory I převedou do komory II kationtoměničovou membránou. Tímto způsobem se získá přímo kalcium-D-pantothenát. Při výskytu solí slabé kyseliny, jako příkladně kyseliny pantot- henové, je možné takovým uspořádáním získat také volnou ky- selinu D-pantothenovou, jestliže se do komory I předloží místo  $\text{CaCl}_2$  vodný roztok  $\text{HCl}$ .

Podle vynálezu je zahrnuto také použití vápenatých a/nebo hořečnatých solí ve formě anorganických nebo organic- kých aniontů. S výhodou se podle vynálezu použijí chlorid vápenatý a/nebo hořečnatý, dusičnan, hydroxid, mravenčan, acetát, propionát, glycinát nebo laktát.

V jedné formě provedení předloženého vynálezu se mohou při použití bipolární elektrodialýzy převést výhodným způsobem kationty při současné přípravě protonů - disociací vody v bipolární membráně - z roztoku obsahujícího pantothenát kationtoměničovou membránou do druhého roztoku a tak je odstranit z roztoku obsahujícího kyselinu pantothenovou. Ve druhém roztoku tvoří hydroxidové ionty vytvořené disociací vody na bipolární membráně odpovídající báze převedených kationtů.

V další formě provedení předloženého vynálezu se mohou při použití bipolární elektrodialýzy výhodným způsobem pře- vést anionty při současném uvolnění hydroxidových iontů - disociací vody v bipolární membráně - z roztoku obsahujícího pantothenát přes aniontoměničovou membránu do druhého roztoku a tak je odstranit z roztoku obsahujícího kyselinu

pantothenovou. Ve druhém roztoku se tvoří kyseliny odpovídající převedeným aniontům s pomocí protonů uvolněných disociací vody na bipolární membráně.

Podle vynálezu je zahrnuta také další varianta provedení při které se při použití bipolární elektrodialýzy na jedné straně výhodným způsobem převedou anionty při současném uvolnění hydroxidových iontů - disociací vody v bipolární membráně - z roztoku obsahujícího pantothenát přes aniontoměničovou membránu do druhého roztoku a tím se odstraní z roztoku obsahujícího kyselinu pantothenovou a na druhé straně se převedou kationty při současném uvolnění protonů - disociací vody v bipolární membráně - z roztoku obsahujícího pantothenát přes kationtoměničovou membránu do třetího roztoku a tím se odstraní z roztoku obsahujícího kyselinu pantothenovou. Ve druhém roztoku se tvoří kyseliny odpovídající převedeným aniontům s pomocí protonů uvolněných disociací vody na bipolární membráně a ve třetím roztoku se tvoří báze odpovídající převedeným kationtům s pomocí hydroxidových iontů uvolněných disociací vody na bipolární membráně.

Podle vynálezu je při předloženém způsobu dále výhodné nastavení pH hodnoty roztoku obsahujícího pantothenát na isoelektrický bod kyseliny pantothenové s pomocí kyselin nebo bází. Na základě toho je možné dále zvýšit výtěžek volné kyseliny D-pantothenové případně dále snížit ztráty.

Monopolární elektrodialýza je obzvláště výhodnou variantou, protože je ve srovnání s bipolární elektrodialýzou cenově velmi výhodná.

Bipolární elektrodialýza se nabízí obzvláště tehdy,

kdy se nemají přidávat kyseliny k nastavení pH hodnoty nebo jestliže se mají vznikající kyseliny nebo louhy dále používat.

Všechny varianty elektrodialýzy podle vynálezu nabízejí výhodu v tom, že z regenerace iontoměničových pryskyřic nevznikají žádné odpadní vody.

Použitím elektroseparačních způsobů podle vynálezu se z roztoku obsahujícího D-pantothenát odstraní výhodně nežádoucí nízkomolekulární ionty (cizí ionty) jako jsou amoniové, draselné, sodné, železnaté, chloridové, fosforečnanové nebo síranové ionty. To znamená, že vzniká s výhodou volná kyselina D-pantothenová nebo požadované soli, jako je kalcium- a/nebo magnesium-D-pantothenát. Podle vynálezu se obsah jednomocných kationtů, s výhodou amoniových, draselných a/nebo sodných iontů sníží na koncentraci  $\leq 1$  g/kg roztoku.

Také obsah nežádoucích aniontů, jako jsou například chloridové, síranové nebo fosforečnanové ionty se může podstatně snížit volbou iontoměničové membrány, s výhodou použitím aniontoměničových membrán.

Takto získaný roztok obsahující volnou kyselinu D-pantothenovou se podle vynálezu upraví přidávkem vápenaté a/nebo hořečnaté báze na hodnotu pH 3 až 10. Výhodná je pH hodnota 5 až 10. Výhodné je nastavení pH hodnoty na 5 až 9, obzvláště výhodně na 6 až 9 a zcela obzvláště výhodně na hodnotu 6 až 8. Tímto způsobem se získá roztok obsahující kalcium- a/nebo magnesium-pantothenát. S výhodou se do roztoku k neutralizaci přidá hydroxid vápenatý, uhličitán vápenatý, oxid vápenatý, hydroxid hořečnatý a/nebo bázický

uhličitan hořečnatý ve formě pevné látky a/nebo vodné suspenze.

Přitom je podle vynálezu výhodné, jestliže se neutralizace roztoku obsahujícího volnou kyselinu D-pantothenovou provádí s pomocí vápenaté a/nebo hořečnaté báze ve formě vodné suspenze. Použitím vodné disperze probíhá neutralizace rychleji a bez výraznějšího kolísání pH než jak je tomu při použití odpovídající pevné látky.

Způsob podle vynálezu se vyznačuje tím, že se k roztoku v kroku c) 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 roztoku v kroku c) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 65 % hmotnostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště výhodně 20 až 40 % hmotnostních uhličitanu vápenatého. V jedné další variantě provedení předloženého vynálezu se k roztoku v kroku c) 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 roztoku v kroku c) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 25 % hmotnostních, s výhodou 10 až 20 % hmotnostních bázeického uhličitanu hořečnatého.

Sušení a/nebo formulace fermentačního roztoku se provádí 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 tím spojenými vlastnostmi produktu se mohou jemné částice oddělit a uvést zpět. Dále se mohou velké částice semlít v mlýně a následně rovněž uvést zpět.

Podle vynálezu je výhodné při výše popsaném způsobu redukce nákladných zpracovatelských kroků, obzvláště 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 vynálezu výhodně tak, že je jednodušší, méně náchylný k poruchám, méně časově náročný, výrazně ekonomičtější a tím hospodárnější než obvyklé způsoby.

To však nevylučuje, aby se způsob podle vynálezu neobměňoval. Výše uvedené procesní korky a) až d) 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 (fakultativních) procesních kroků se (základními) procesními kroky a) až d).

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

V dalších variantách způsobu podle vynálezu se může

před sušením a/nebo formulací roztoku provést nejméně jeden a/nebo kombinace následujících kroků, zahrnující lysi a/nebo usmrcení biohmoty a/nebo oddělení biohmoty 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 biohmoty provádí ještě ve fermentačním roztoku nebo teprve po oddělení biohmoty od fermentačního roztoku. To se může provádět příkladně tepelným ošetřením, s výhodou při teplotě 80 až 200 °C a/nebo okyšením, 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 v krocích a), b) nebo c) způsobu podle vynálezu oddělit filtrací, separací (příkladně odstředěním) a/nebo dekantováním. Možné je také uvádět roztoky z kroků a), b) nebo c) bez oddělení obsažených mikroorganismů přímo přes jednu nebo několik iontoselektivních membrán v elektrickém poli.

Výsledný roztok ze zpracování membránovou elektrolýzou nebo elektrodialýzou se může návazně na neutralizaci koncentrovat na vhodné odparce, příkladně odparce se stékajícím filmem, odparce v tenké vrstvě nebo rotační odparce. Takové 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 rozto-

kům 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 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 biohmoty. Následně se tento vyčištěný roztok vede v elektrickém poli přes jednu nebo několik iontoselektivních membrán.

Následné sušení tohoto roztoku se může provádět příkladně rozstřikovacím sušením. To se může provádět v souproudu, protiproudu nebo ve smíšeném proudění. K rozprášení se mohou použít všechny známé rozprašovače, obzvláště odstředivé rozprašovače (rozprašovací disky), jednodruhové trysky nebo dvoudruhové 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 teplotě. K dosažení velmi nízké zbytkové vlhkosti se

ale může dodatečně provést další fáze sušení ve vířivém loži.

Rozstřikovací sušení se může provádět v sušárnách FSD nebo SBD (FSD : Fluidized Spray Dryer, SBD : Spray Bed Dryer), které vyrábí firmy Niro (Kodaň, Dánsko) a APV-Anhydro (Kodaň, Dánsko), které představují kombinaci rozstřikovací sušárny a vířivého lože.

Při rozstřikovacím 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 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, s výhodou 0 g/l volného  $\beta$ -alaninu a/nebo

solí  $\beta$ -alaninu

- b) fermentační roztok obsahující D-pantothenát se uvádí vytvořením elektrického pole přes jednu nebo několik iontoselektivních membrán, přičemž se z roztoku obsahujícího D-pantothenát odstraní nízkomolekulární ionty,
- c) 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
- d) roztok obsahující kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát se podrobí sušení a/nebo tvorbě formulace.

Při jedné variantě předloženého vynálezu se vyznačuje přípravek tím, že se v kroku c) nebo d) získá nebo předloží suspenze, která obsahuje kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát.

Podle vynálezu se přípravek dále vyznačuje tím, že obsahuje soli kyseliny D-pantothenové v koncentraci nejméně 1 až 100 % hmotnostních, s výhodou nejméně 20 až 100 % hmotnostních a obzvláště výhodně nejméně 50 % hmotnostních. Předmětem předloženého vynálezu je přípravek, který obsahuje soli kyseliny D-pantothenové ve formě dvojmocných kationtů, s výhodou kalcium-D-pantothenát a/nebo magnesium-D-pantothenát. Podle vynálezu je výhodný přípravek, který se vyznačuje tím, že obsah solí kyseliny D-pantothenové ve formě jednomocných kationtů je  $\leq 1$  g/kg.

Podle vynálezu se výše popsaným způsobem získá kalcium-D-pantothenát a/nebo magnesium-D-pantothenát, který vyhoví 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
Přípravek proti pění	1 ml/l

Po sterilizaci byly navíc přidány následující sterilní komponenty media:



Násada	Koncentrace (g/l)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	20
Glukoza	2,5
Chlorid vápenatý	0,1
Chlorid hořečnatý	1
Natriumcitrát	0,1
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1
Roztok stopových solí	1 ml/l

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  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,7 g  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , doplněno vodou na 1 l. Přídavek roztoku stopových solí se provádí po sterilizaci. Počáteční objem kapaliny činí 8,4 l. Výše uvedené obsahy jsou vztaheny na tuto hodnotu.

K tomuto roztoku se přidá 160 ml očkovací kultury (OD = 10 v mediu SVY (25 g Difco Veal Infusion Broth, 5 g Difco Yeast Extract, 5 g glutamátu sodného, 2,7 g síranu amonného ve 740 ml vody, sterilizuje se, následně se přidá 200 ml sterilního 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,0) a 60 ml 50 %-ního sterilního roztoku glukozy (konečný objem 1 l)) *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 52 hodin se nadávkuje 6 l sterilního vodného

roztoku. Složení je následující :

Násada	Koncentrace (g/l)
Glukoza	500
Chlorid vápenatý	0,6
Roztok stopových solí	7 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. Tvorba pěny se řídí občasným nadávkováním prostředku proti pění. 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 60 minut. Usmrcení bylo prokázáno na deskách. Následně se odstředěním provede oddělení buněk. Po oddělení buněk činí koncentrace D-pantothenátu po 52 hodinách 24,7 g/l.

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

Tento produkt fermentace, který se výše popsaným způsobem sterilizuje zahřátím a v podstatě se zbaví biohmoty odstředěním se smíchá s dodatečnou kyselinou D-pantotheno-

vou a pomocí kyseliny sírové se upraví hodnota pH na přibližně 2. Takto získaný roztok se filtruje přes malé lože písek/aktivní uhlí. Obsah kyseliny D-pantothenové v tomto roztoku činí 67,7 g/l.

900 g tohoto filtrátu se zpracuje elektrodialyticky následovně :

do elektrodialyzační buňky se (vybavené aniontoměničovými a kationtoměničovými membránami (typ Neosepta AMX Sb případně CMX Sb firmy Tokuyama Corp.) s efektivní plochou buňky  $1,85 \text{ dm}^2$  a s pěti komorami se nasadí filtrát při počáteční proudové hustotě  $29 \text{ mA/cm}^2$ . Hustota proudu se v průběhu pokusu po dosažení předem daného hraničního napětí 20 V kontinuálně snižuje. Teplota je mezi 33 a 40 °C. Jako násada koncentrátu se předloží 0,5 %-ní (w/w) roztok NaCl. Tento koncentrát (KONZ) se v průběhu pokusu obohacuje cizími ionty odstraněnými z filtrátu (diluátu, DIL) (příkladně amoniové, chloridové, železnaté, draselné sodné nebo fosforečnanové ionty). Do elektrolytického okruhu se k promytí elektrod předloží 5 %-ní roztok (w/w) síranu sodného . V průběhu pokusu se při rozdílných hodnotách ionické vodivosti odebírají vzorky roztoku diluátu z komory obsahující diluát a analyzují se. Analýze je uvedena v následující tabulce a vyplývá z ní, že s pokračující dobou pokusu se z diluátu odstraňují uvedené ionty a vodivost diluátu odpovídajícím způsobem klesá. Malé, jednomocné ionty, jako jsou příkladně chloridové ionty se odstraňují rychleji než objemné, více-mocné ionty, jako jsou příkladně fosforečnanové ionty.

Výsledky analýzy diluátu jsou uvedeny v následující tabulce :

T A B U L K A

		IONTY (analýza U-LABOR)									
	PTS	amonium	Cl	o-fosforečnan	Ca	Fe	K	Mg	Na		
	g/l										
Edukt (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 - konec	76,0	0,01 %	< 0,01 %	0,21 %	< 0,001 %	< 0,001 %	0,009 %	< 0,001 %	0,010 %		

PTS = kyselina pantothenová

Hodnoty pH všech vzorků diluátu leží mezi 2 až 3. Ve výtěžku 771 g diluátu je obsaženo 76 g/l volné kyseliny D-pantothenové.

Tím je doloženo, že fermentativně získaný roztok kyseliny D-pantothenové lze úspěšně elektrolyticky zbavit rušivých kationtů. Ze získané odsolené kyseliny D-pantothenové se nechá vyrobit nehygroskopický prášek kalcium-D-pantothenátu, jak se popisuje v příkladu 2.

#### 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
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8,4
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	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
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,01
Roztok stopových solí	1 ml

Roztok stopových solí má následující složení :

0,15 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,7 g CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 0,25 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 1,6 g MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 0,3 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>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 v mediu SVY (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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0) a 60 ml 50 %-ního sterilního roztoku glukozy (konečný objem 1 l)), 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 glukózou. V prů-  
hu fermentace se dávkováním 25 %-ního roztoku amoniaku pří-  
padně 20 %-ní kyseliny fosforečné udržuje hodnota pH na  
7,2. Amoniak zároveň slouží jako zdroj dusíku pro  
fermentaci. Počet otáček míchadla se reguluje, přičemž ob-  
sah rozpuštěného kyslíku se udržuje na hodnotě 30 % hodnoty  
při nasycení. Tvorba pěny se řídí občasným nadávkováním  
prostředku proti pění. Po přerušení dávkování zdroje uh-  
líku se fermentace vede dále tak dlouho, dokud obsah rozpuš-  
tění 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 titer kyseliny pantothenové bez dokr-  
mování  $\beta$ -alaninu více jak 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55,  
60, 65, 70, 75, 80, 85 a > 90 g/l.

2817 ml produktu z fermentace se smísí s 1183 ml roz-  
toku kyseliny pantothenové o koncentraci 178,9 g/l a  
neutralizuje se 25 %-ním roztokem hydroxidu amonného (pH  
6,5). Následně se filtruje přes písek/aktivní uhlí. Obsah  
kyseliny D-pantothenové ve filtrátu činí 67 g/l, převážně ve

formě amonné soli.

Přibližně 720 g tohoto roztoku se zpracuje elektrodiálýzou podle příkladu 1 :

550 g produktu diluátu (o hustotě 1,017 g/ml) se s pomocí 3,5 g 40 %-ní suspenze hydroxidu vápenatého upraví na hodnotu pH 7,5. Získá se vodný roztok kalcium-D-pantothenátu (551,03 g s obsahem kalcium-D-pantothenátu 40,9 g/l).

Vodný roztok kalcium-D-pantothenátu se vysuší v laboratorní rozstříkovací sušárně firmy Niro, typ Minor. Teplota na vstupu do věže činí asi 200 °C, teplota na výstupu z věže je 90 °C. Rozprášení se provádí pomocí dvoudruhové trysky při tlaku 0,2 MPa. Jako pudrovací prostředek se použije Sipemat 22F. Získá se přitom práškovitý produkt o následující specifikaci (údaje v % hmotnostních) :

Obsah vody :	2,3 %
Kalcium-D-pantothenát :	46,1 %
Amonium :	0,60 %
Draslík :	0,47 %
Sodík :	1,1 %

### P ř í k l a d 3

V laboratorním fermentoru s míchadlem a plynovacím zařízením o obsahu 200 l se smíchá 800 g 50 %-ního kvasnicového extraktu, 438 g glutamátu sodného, 3200 g sojové moučky, 640 g síranu amonného, 800 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1600 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 50 ml prostředku proti pění TegoKS se 70 l vody a sterilizuje po dobu 30 minut při teplotě 121 °C.

Následně se přidá roztok 1 a roztok 2.

Roztok 1 se připraví následovně :

1670 g glukózy x H<sub>2</sub>O, 10,2 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O a 170,7 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O se rozpustí v 9 l vody a sterilizuje se po dobu 30 minut.

Roztok 2 se připraví následovně :

800 ml roztoku citrátu železnatého (200 g/l citrátu sodného, 2 g/l FeSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, sterilizováno) se smíchá s 80 ml roztoku stopových solí ( 0,15 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,7 g CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 0,25 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 1,6 g MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 0,3 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, doplněno vodou na 1 l, sterilizováno).

K tomuto roztoku se přidají 2 l očkovací kultury (OD = 10 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0) a 60 ml 50 %-ního sterilního roztoku glukózy (konečný objem 1 l)), *Bacillus subtilis* PA 668 a za intenzivního míchání se fermentuje při teplotě 43 °C při plynování 3 m<sup>3</sup>/min. Tento kmen se popisuje v příloze přihlášky US-Serial-Nr. 60/262995.

V průběhu 48 hodin se nadávkuje asi 10 l sterilního vodného roztoku glukózy. Roztok se připraví následovně : 90 kg glukózy x H<sub>2</sub>O se smíchá s 55 kg vody a sterilizuje se po dobu 30 minut. Následně se přidá 300 ml roztoku stopových solí (složení viz výše) a rovněž 3 l roztoku citrátu železnatého (složení viz výše). Následně se přidá 1 l sterilně filtrovaného roztoku 90 g/l CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O a 2 l sterilně filtrovaného roztoku 375 g/l glutamátu sodného.

Fermentace se provádí s limitovanou glukozou. V prů-  
hu fermentace se dávkováním 25 %-ního roztoku amoniaku pří-  
padně 20 %-ní kyseliny fosforečné udržuje hodnota pH na  
7,2. Amoniak zároveň slouží jako zdroj dusíku pro  
fermentaci. Počet otáček míchadla se reguluje, přičemž ob-  
sah rozpuštěného kyslíku se udržuje na hodnotě 30 % hodnoty  
při nasycení. Tvorba pěny se řídí občasným nadávkováním  
prostředku proti pění. Po přerušení dávkování zdroje uh-  
líku se fermentace vede dále tak dlouho, dokud obsah rozpuš-  
tění kyslíku ( $pO_2$ ) nedosáhne hodnoty 95 % při nasycení.  
Potom se fermentace ukončí. Oddělení buněk se provede sepa-  
rací na talířovém separátoru. Zbývající buňky se usmrtí  
termicky sterilizací. Koncentrace D-pantothenátu při přeru-  
šení po 48 hodinách činí 13,7 g/l. Po separaci a steriliza-  
ci je koncentrace D-pantothenátu 10,7 g/l.

Analogickým způsobem je také možné vyrobit fermentační  
břečky, které vykazují titer kyseliny pantothenové bez dokr-  
mování  $\beta$ -alaninu více jak 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50,  
55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 a více jak 90 g/l.

Se 3000 g takto předupraveného fermentačního roztoku  
se postupuje následovně :  
dvě třetiny násady se smíchají při teplotě asi 10 °C s množ-  
stvím roztoku  $CaCl_2$  (40 %) odpovídajícím ekvivalentní kon-  
centrací vícemocných aniontů, třetina násady se vysráží  
 $Ca(OH)_2$  (pevný) v ekvivalentním množství. Roztoky se uloží  
přes noc do ledničky a potom se s pomocí tlakové filtrační  
nuče (Seitz Tiefenfilter 700) oddělí od vysrážené úsady.  
Roztoky se potom smísí a přidavkem dalších 10 g  $Ca(OH)_2$  při  
teplotě asi 10 °C se upraví bazické prostředí (pH = 8,7) a  
dosráží se. Sraženina se rovněž odfiltruje.

1800 g roztoku se potom při teplotě 35 °C zpracuje v trojúhelníkovém elektrodialyzačním zařízení. Přitom se fermentační břečka vede přes produktovou komoru ohraničenou dvěma kationtoměničovými membránami. Na katodové straně odděluje monoselektivní kationtoměničová membrána (Tokuyama Soda, CMS) produkt z okruhu koncentrátu, na anodové straně se v produktové komoře s obvyklou kationtoměničovou membránou (Tokuyama Soda, CMX) odděluje z okruhu  $\text{CaCl}_2$ . Okruh koncentrátu a  $\text{CaCl}_2$  se odděluje aniontoměničovou membránou (Tokuyama Soda, AMX). Do koncentrátu se předloží 750 g 0,5 %-ního roztoku chloridu sodného, do okruhu  $\text{CaCl}_2$  900 g 3,05 %-ního roztoku  $\text{CaCl}_2$ . V promývacím okruhu elektrod cirkuluje 0,1 molární roztok síranu sodného. Pokus se provádí galvanostaticky při 30 mA/cm<sup>2</sup> v zařízení sestávajícím z 5 výše popsaných základních jednotek s celkovou plochou membrány 500 cm<sup>2</sup> šaržovým způsobem. Jako kritérium pro ukončení byl zvolena minimální vodivost 4 mS/cm v okruhu  $\text{CaCl}_2$ . Výsledky analýzy kationtů v produktovém okruhu a v okruhu koncentrátu jsou shrnuty v následující tabulce.

	PTS (g/l)	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{NH}_4^+$
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 produkt $t=0$ h	0,0	0,0 %	0,2 %	0,0 %	0,0 %
5329/01/82 produkt $t=0,83$	0,015	0,02 %	0,47 %	0,71 %	0,29 %

Z toho se vypočítá obohacení 51 % pro sodík, 66 % pro

13.08.03

amonium a 61 % pro draslík. Střední proudový výtěžek činí 82 %. Ztráta kyseliny pantothenové v obou hraničních okruzích činí vždy 0,08 % nasazeného množství látky. pH hodnota produktového okruhu je během pokusu mezi 7 až 7,5, v okruhu koncentrátu a v okruhu  $\text{CaCl}_2$  asi  $\text{pH} = 6$ . Celkový pokles napětí stoupl v průběhu pokusu ve shodě s poklesající vodivostí v okruhu  $\text{CaCl}_2$  z asi 11 na 16 V.

Roztok takto zpracovaný elektrodialýzou se následně úspěšně vysuší rozstříkáním na konečný produkt. Tím se dokládá, že při odpovídající přípravě se může použít trojúhelníková elektrodialýza s jednou monoselektivní kationtoměničovou membránou k výměně jednomocných iontů za dvojmocné kationty, aby se zlepšila sušitelnost konečného produktu rozstříkáním.

Dr. Milos VSETEČKA  
advokát  
VSO 23 VTIAMA 2, Praha 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, 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 volného  $\beta$ -alaninu a/nebo solí  $\beta$ -alaninu
  - b) fermentační roztok obsahující D-pantothenát se uvádí vytvořením elektrického pole přes jednu nebo několik iontoselektivních membrán, přičemž se z roztoku obsahujícího D-pantothenát odstraní nízkomolekulární ionty,
  - c) volná kyselina D-pantothenová obsažená v roztoku se přidávkem vápenaté a/nebo hořečnaté báze upraví na hodnotu pH 5 až 10, přičemž se získá roztok, který obsahuje kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát a
  - d) roztok obsahující kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát 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 ke kultivačnímu

mediu nepřidává žádný volný  $\beta$ -alanin a/nebo soli  $\beta$ -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-pantothenovou 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 pantothenové 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 se v kroku c) upraví pH roztoku na hodnotu 5 až 10.

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 se v kroku c) upraví pH roztoku na hodnotu 5 až 9, s výhodou 6 až 9 a obzvláště výhodně na 6 až 8.

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 b) použije monopolární a/nebo bipolární iontoměničová membrána.

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 b) použije monopolární iontoměničová membrána.

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 b) použije monoselektivní iontoměničová membrána.

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 pH hodnota fermentačního roztoku obsahujícího kysleinu D-pantothenovou upraví před zpracováním v kroku b) na isoelektrickou pH hodnotu kyseliny pantothenové.

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 b) nastaví pro monopolární iontoměničovou membránu hustota proudu 1 až 100 mA/cm<sup>2</sup>, s výhodou 10 až 80 mA/cm<sup>2</sup>, a obzvláště výhodně 20 až 40 mA/cm<sup>2</sup>.

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 v kroku b) nastaví pro bipolární iontoměničovou membránu hustota proudu 1 až 150 mA/cm<sup>2</sup>, s výhodou 30 až 100 mA/cm<sup>2</sup>, a obzvláště výhodně 70 až 90 mA/cm<sup>2</sup>.

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 v kroku b) obsah jednomocných kationtů, s výhodou amoniových, draselných a/nebo sodných iontů sníží na koncentraci  $\leq 1$  g/kg roztoku.

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 c) přidá k neutralizaci hydroxid vápenatý, uhličitan vápenatý, oxid vápenatý, hydroxid hořečnatý a/nebo bázičkový uhličitan hořečnatý ve formě pevné látky a/nebo vodné suspenze.

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 c) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 55 % hmotnostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště výhodně 20 až 40 % hmotnostních hydroxidu vápenatého.

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 c) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 65 % hmotnostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště výhodně 20 až 40 % hmotnostních uhličitanu vápenatého.

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 do roztoku v kroku c) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 60 % hmotnostních, s výhodou 10 až 50 % hmotnostních a obzvláště výhodně 20 až 40 % hmotnostních hydroxidu hořečnatého.

20. Způsob podle některého z nároků 1 až 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do roztoku v kroku c) přidá vodná suspenze obsahující 2 až 25 % hmotnostních, s výhodou 10 až 20 % hmotnostních bázičkého uhličitanu hořečnatého.

21. Způsob podle některého z nároků 1 až 20, 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 kalciumpantothe-

nát a/nebo magnesiumpantothenát.

22. 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, s výhodou 0 g/l volného  $\beta$ -alaninu a/nebo solí  $\beta$ -alaninu
- b) fermentační roztok obsahující D-pantothenát se uvádí vytvořením elektrického pole přes jednu nebo několik iontoselektivních membrán, přičemž se z roztoku obsahujícího D-pantothenát odstraní nízkomolekulární ionty,
- c) 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
- d) roztok obsahující kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát se podrobí sušení a/nebo tvorbě formulace.

23. Přípravek podle nároku 22,

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 kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát.

24. Přípravek podle některého z nároků 22 nebo 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje soli kyseliny D-pantothenové ve formě dvojmocných kationtů, s výhodou kalciumpantothenát a/nebo magnesiumpantothenát.

25. Přípravek podle některého z nároků 22 nebo 24, 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.

26. Přípravek podle některého z nároků 22 až 25, 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  $\leq 1$  g/kg.