



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 967**

51 Int. Cl.:
C12P 13/02 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02719874 .6**
86 Fecha de presentación : **20.02.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1362118**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Procedimiento para la producción de ácido D-pantoténico y/o sus sales como aditivo de alimentos para animales.**

30 Prioridad: **21.02.2001 DE 101 08 223**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

73 Titular/es: **BASF Aktiengesellschaft
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es: **Baldenius, Kai-Uwe;
Beck, Christine;
Fischer, Andreas;
Harz, Hans-Peter;
Lohscheidt, Markus y
Leemann, Martin**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 274 967 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 274 967 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de ácido D-pantoténico y/o sus sales como aditivo de alimentos para animales.

5 La presente invención se refiere a un método mejorado para la producción de ácido D-pantoténico y/o sus sales y a su uso como aditivo de alimentos para animales.

10 El D-pantotenato es un producto de partida de la biosíntesis de la coenzima A muy extendido en el mundo animal y vegetal. En contraposición con el ser humano, que ingiere el ácido pantoténico en cantidades suficientes a través de la alimentación, sin embargo se describen con frecuencia tanto para las plantas como para los animales síntomas de deficiencia para el D-pantotenato. Por tanto, la disponibilidad de D-pantotenato es de gran interés económico, especialmente en la industria de los alimentos para animales.

15 De manera convencional, la producción de D-pantotenato tiene lugar mediante la síntesis química a partir de D-pantolactona y β -alaninato de calcio (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª edición, 1999, versión electrónica, capítulo "Vitamins"). Para la preparación de D-pantolactona se necesita un clásico desdoblamiento de racematos costoso a través de sales diastereómeras. El producto comercial que resulta a partir de la síntesis química es en la mayoría de los casos la sal de calcio del ácido D-pantoténico, D-pantotenato de calcio.

20 Con respecto a la síntesis química la ventaja de los procedimientos de producción biotecnológicos con microorganismos radica en la preparación selectiva (pura desde el punto de vista de los enantiómeros) de la forma D del ácido pantoténico útil para los organismos superiores. Por consiguiente se suprime un desdoblamiento de racematos costoso, tal como es necesario en el caso de la síntesis química.

25 Se conocen numerosos casos de procedimientos fermentativos para la producción de ácido D-pantoténico con microorganismos, así entre otros a partir de los documentos 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 y EP 1 006 193.

30 Así describían los documentos EP 1 006 189 y EP 1 001 027 procedimientos para la producción de pantotenato en los que en la solución de fermentación se alcanza un contenido como máximo de 1 g/l de ácido D-pantoténico. Sin embargo, tales contenidos reducidos de ácido pantoténico en la solución de fermentación, o sea inferiores al 10% en peso con respecto al contenido en sólidos, no son adecuados para una producción económica de complementos de alimento para animales que contienen ácido D-pantoténico. Otro inconveniente en los procedimientos descritos hasta el momento es, que el aislamiento del producto a partir del medio de fermentación requiere numerosas etapas de tratamiento costosas. No se da a conocer un procedimiento de producción económico para la escala industrial.

35 En la publicación para información de solicitud de patente alemana DE 100 16 321 se describe un procedimiento de fermentación para la producción de un complemento de alimento para animales que contiene ácido D-pantoténico. Sin embargo un inconveniente esencial de este procedimiento es, al igual que en el caso de los procedimientos fermentativos mencionados anteriormente para la producción de ácido D-pantoténico, que al microorganismo se le debe añadir a través del medio de fermentación obligatoriamente el precursor del ácido pantoténico β -alanina, para obtener rendimientos económicos del producto deseado.

45 Además los documentos US 6.013.492 y WO 96/332839 describen el tratamiento del ácido D-pantoténico a partir de la solución de fermentación mediante la filtración de componentes insolubles (por ejemplo material celular) del medio de cultivo, una adsorción del filtrado en carbón activado, una elución posterior del ácido D-pantoténico con un disolvente orgánico, preferiblemente metanol, una neutralización con hidróxido de calcio y una cristalización posterior de D-pantotenato de calcio. Inconvenientes esenciales son las pérdidas de producto de valor que aparecen durante la cristalización así como el uso de un disolvente orgánico, que sólo puede eliminarse del producto con dificultad y que hace necesaria una recuperación del disolvente costosa.

50 El documento EP 0 590 857 describe un procedimiento de fermentación para la producción de ácido D-pantoténico, en el que el cultivo de un microorganismo requiere obligatoriamente la adición de β -alanina. Se filtra la solución de fermentación para la separación de la biomasa, entonces se conduce a través de un intercambiador catiónico y posteriormente a través de un intercambiador aniónico, a continuación de esto se neutraliza con hidróxido de calcio, se concentra, se mezcla con carbón activado, se filtra otra vez y se cristaliza con la adición de metanol y cloruro de calcio. El producto que contiene pantotenato de calcio resultante contiene además de ácido D-pantoténico en forma de la sal de calcio incluso cloruro de calcio en una razón molar de 1:1. Para la reducción del contenido en cloruro de calcio se requiere una electrodiálisis con un secado por pulverización posterior. Este procedimiento tiene la desventaja de no ser económico ni ecológico debido el gran número de etapas de procedimiento costosas y al uso de disolventes orgánicos.

65 Es objetivo de la presente invención la preparación de un complemento de alimento para animales que contiene ácido D-pantoténico y/o sus sales así como su producción mediante un procedimiento mejorado para la producción de ácido D-pantoténico y/o sus sales, que no presenta los inconvenientes mencionados anteriormente. A este respecto es deseable, por motivos económicos, un procedimiento, en el que se reduce drásticamente una adición de β -alanina o ni siquiera es necesaria. Además es deseable la producción de ácido D-pantoténico en forma de sus sales bivalentes y a este respecto sobre todo de las sales alcalinotérreas, dado que las sales bivalentes presentan menos propiedades higros-

cópicas que las sales monovalentes del ácido pantoténico y para el uso adicional, por ejemplo como complemento de alimento para animales, tienden por consiguiente con menor intensidad a apelmazamientos. Este objetivo se soluciona ventajosamente mediante la presente invención.

5 Objeto de la presente invención es un procedimiento para la producción de ácido D-pantoténico y/o sus sales, caracterizado porque

10 a) se utiliza al menos un microorganismo que produce ácido D-pantoténico, cuya biosíntesis de ácido pantoténico (pan) y/o de isoleucina/valina (ilv) está desregulada y que forma al menos 2 g/l de sales del ácido pantoténico mediante la fermentación en un medio de cultivo, añadiéndose al medio de cultivo 0 - 20 g/l de β -alanina libre y/o sal de β -alanina,

15 b) se conduce la solución de fermentación que contiene D-pantotenato mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de una o varias membranas selectivas de iones, eliminándose los iones de bajo peso molecular de la solución que contiene D-pantotenato,

20 c) se ajusta el ácido D-pantoténico libre contenido en la solución mediante la adición de una base de calcio y/o de magnesio hasta un valor de pH de 5-10, obteniéndose una solución, que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio y

d) se somete la solución que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio a un secado y/o formulación.

25 En una variante del procedimiento según la invención se obtiene o se coloca previamente en la etapa c) o d) una suspensión, que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio.

Además la fermentación que tiene lugar según la invención en la etapa a) puede realizarse según modos de proceder conocidos con un funcionamiento discontinuo, discontinuo con alimentación o discontinuo con alimentación repetida o con una dirección del proceso continua. A este respecto para la neutralización del ácido pantoténico que se produce se utilizan sistemas tampón habituales, tales como por ejemplo tampón fosfato con NaOH, KOH o amoniaco.

30 En variantes adicionales del procedimiento según la invención se forman en la etapa a) al menos 10 g/l, preferiblemente al menos 20 g/l, especialmente preferible al menos 40 g/l, lo más especialmente preferible al menos 60 g/l y especialmente al menos 70 g/l de sales del ácido D-pantoténico mediante fermentación en el medio de cultivo.

35 Según la invención debe entenderse por la formulación "producir", que el microorganismo puede sintetizar mayores cantidades de ácido D-pantoténico y/o sus sales, que las que son necesarias para las propias demandas metabólicas. En una variante ventajosa según la invención la cantidad sintetizada de ácido D-pantoténico y/o sus sales no se encuentra en el interior de las células, sino que se desprende de manera ideal del microorganismo al medio de cultivo. Esta expulsión puede tener lugar de manera activa o pasiva según mecanismos en sí conocidos.

40 Según la invención se utilizan como microorganismos que producen ácido D-pantoténico hongos, levaduras y/o bacterias. Según la invención se utilizan preferiblemente hongos tales como por ejemplo Mucor o levaduras, tales como por ejemplo *Saccharomyces* o *Debaromyces* y a este respecto preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*. Ventajosamente se utilizan según la invención bacterias corineformes o *Bacillaceae*. Según la invención se comprenden preferiblemente por ejemplo bacterias de los géneros *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Acinetobacter* o *Rhizobium*. A este respecto se prefieren especialmente por ejemplo *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium breve* o *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* y otras clases de *Bacillus* del grupo 1, que se caracterizan por su 16s ARN o *Actinum mycetalis*. Esta enumeración sirve para la explicación y no es de ninguna manera limitante para la presente invención.

45 Además la presente invención comprende también la utilización de microorganismos modificados genéticamente para la producción según la invención de un complemento de alimento para animales que contiene ácido D-pantoténico libre y/o sus sales. Los microorganismos modificados genéticamente de este tipo pueden aislarse por ejemplo mediante mutagénesis química y selección posterior mediante un "procedimiento de selección" adecuado. Según la invención se comprenden también las denominadas "cepas de producción", que son adecuadas para la producción del producto en el sentido de la presente invención y que presentan modificaciones genéticas con respecto al flujo metabólico en la dirección del ácido D-pantoténico, estando incluidas también las modificaciones con respecto a la expulsión del ácido D-pantoténico y/o sus sales a través de la membrana celular. Esto puede conseguirse por ejemplo mediante modificaciones en las posiciones clave en rutas de biosíntesis metabólicas del microorganismo utilizado.

50 Es concebible también la utilización de microorganismos transgénicos, que resultan de la transferencia de secuencias de nucleótidos homólogas y/o heterólogas, que son necesarias o pueden ser favorables para la síntesis del producto deseado. A este respecto es concebible la sobreexpresión y/o desregulación de uno o varios genes individualmente y/o en combinación, localizados en el genoma y/o en un vector. Los microorganismos transgénicos de este tipo pueden contener ventajosamente copias adicionales y/o genes modificados genéticamente seleccionados del grupo de panB, panC, panD, panE y/o sus combinaciones y/o incluso unidades de organización, tal como el operón panBCD. Además

pueden manipularse ventajosamente en los microorganismos otras rutas metabólicas, tales como por ejemplo la ruta de biosíntesis de isoleucina-valina, tal como se describe por ejemplo en los documentos EP 1 006 189, EP 1 006 192, EP 1 006 193 o EP 1 001 027. Mediante esto se ponen a disposición multiplicadas, las sustancias precursoras de cadena ramificada de la biosíntesis del ácido pantoténico. Ventajosamente se sobreexpresan dado el caso los genes para esta ruta de biosíntesis, es decir *ilvB*, *ilvN*, *ilvC* y/o *ilvD*. Además se comprenden según la invención modificaciones genéticas de la aspartato- α -descarboxilasa (*panD*), por ejemplo mediante la sobreexpresión y/o desregulación, en el microorganismo que produce ácido D-pantoténico utilizado.

Por la formulación “desregulación” debe entenderse según la invención lo siguiente: modificaciones o alteraciones de al menos un gen, que codifica para una enzima en una ruta metabólica biosintética, de modo que la actividad de la enzima está modificada o alterada en el microorganismo. Se prefiere que al menos un gen, que codifica para una enzima de una ruta metabólica biosintética, esté modificado de tal manera, que el producto génico se forma de manera reforzada o presenta una actividad aumentada. El término “ruta metabólica desregulada” incluye también una ruta metabólica biosintética, en la que más de un gen, que codifica para más de una enzima, está modificado o alterado de tal manera, que las actividades de más de una enzima están modificadas o alteradas. Las modificaciones o alteraciones pueden comprender, pero no se limitan a: eliminación del promotor endógeno o de elementos reguladores; inserción de promotores fuertes, promotores inducibles o varios promotores simultáneamente; eliminar secuencias de regulación, de modo que la expresión del producto génico está modificada; modificación de la situación cromosómica del gen; modificación de la secuencia de ADN en la proximidad del gen o dentro del gen tal como por ejemplo del sitio de unión al ribosoma (RBS); aumento del número de copias del gen en el genoma o diferente número de copias mediante la introducción de plásmidos; alteración de proteínas (por ejemplo proteínas de regulación, supresores, potenciadores, activadores transcripcionales, y similares), que desempeñan un papel en la transcripción del gen y/o en la traducción al producto génico. A éstas pertenecen también otras posibilidades para la desregulación de la expresión de genes que son estado de la técnica, tal como por ejemplo el uso de oligonucleótidos antisentido, o el bloqueo de proteínas represoras. La desregulación puede incluir también modificaciones en la región codificante de genes, que conducen por ejemplo a la anulación de la regulación por retroalimentación en el producto génico o a una actividad específica mayor o menor del producto génico.

Además son ventajosas según la invención las modificaciones de ingeniería genética en enzimas, que influyen en la emisión de precursores del ácido pantoténico y/o el flujo del ácido pantoténico para dar coenzima A. A modo de ejemplo, los genes que codifican para tales enzimas son: *alsD*, *avtA*, *ilvE*, *ansB*, *coaA*, *coaX* y otros más. Esta enumeración sirve para la explicación y no es limitante de ninguna manera para la presente invención. Además son ventajosas las modificaciones de ingeniería genética, que garantizan una preparación celular de cofactores (por ejemplo de tetrahydrofolato de metileno, equivalentes redox y similares) en una cantidad óptima para la producción de ácido pantoténico.

De manera ventajosa se encuentra entonces ya la β -alanina en las células en concentraciones aumentadas con respecto a los microorganismos no modificados genéticamente de manera correspondiente y no debe añadirse por consiguiente como precursor al medio de cultivo, tal como es necesario en el documento EP-A-0 590 857. Son ventajosos los microorganismos, cuya biosíntesis del ácido pantoténico (*pan*) y/o la isoleucina-valina (*ilv*) y/o aspartato- α -descarboxilasa (*panD*) está desregulada. Además es ventajosa una sobreexpresión adicional de la cetopantoato-reductasa (*panE*) en los microorganismos.

Además es ventajoso según la invención si dado el caso el gen *coaA*, que es necesario para la síntesis de coenzima A, tiene su actividad reducida o (por ejemplo en las especies de *Bacillus*) está completamente inactiva. Es decir *Bacillus* contiene además de *coaA* otro gen para esta función enzimática (= *coaX*). También la actividad de este gen *coaX* o de la enzima correspondiente pueden modificarse, preferiblemente reducirse, o incluso deleccionarse, siempre que el propio *coaA* presente todavía una actividad enzimática suficiente, aunque reducida, es decir que la actividad enzimática de *coaA* no se ha perdido completamente. Además de la sobreexpresión de los diferentes genes también es ventajosa una manipulación genética de las regiones promotoras de estos genes de tal manera, que esta manipulación conduce a una sobreexpresión de los productos génicos.

En una variante de realización de la presente invención se utilizan las cepas bacterianas descritas según el anexo (documento WO 01/21772), tales como por ejemplo *Bacillus subtilis* PA 824 y/o derivados de los mismos. En una variante de realización preferida se utiliza según la invención el microorganismo *Bacillus subtilis* PA 668, tal como se describe según el anexo (documento US 2004/0091979), en el procedimiento según la invención. Estas cepas de *Bacillus subtilis* PA 824 y PA 668 se produjeron tal como sigue:

Partiendo de la cepa de *Bacillus subtilis* 168 (cepa Marburg ATCC 6051), que presenta el genotipo *trpC2* (*Trp*⁻), se generó mediante transducción del marcador *Trp*⁺ (del tipo natural W23 de *Bacillus subtilis*) la cepa PY79. En la cepa PY79 se insertaron mediante métodos de ingeniería genética clásicos (tal como se describen por ejemplo en Harwood, C. R. y Cutting, S. M. (editores), *Molecular Biological Methods for Bacillus* (1990) John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, Inglaterra) las mutaciones Δ *panB* y Δ *panE1*.

La cepa resultante se transformó con ADN genómico de la cepa PA221 de *Bacillus subtilis* (genotipo *P₂₆panBCD*, *trpC2* (*Trp*⁻)) y ADN genómico de la cepa PA303 de *Bacillus subtilis* (genotipo *P₂₆panE1*). La cepa PA327 resultante tiene el genotipo *P₂₆panBCD*, *P₂₆panE1* y es auxótrofo con respecto al triptófano (*Trp*⁻). Con la cepa PA327 de *Bacillus subtilis* se consiguieron en cultivos de 10 ml con medio SVY (llenar 25 g/l de caldo infusión de ternera de Difco, 5 g/l de extracto de levadura de Difco, 5 g/l glutamato de Na,

ES 2 274 967 T3

2,7 g/l sulfato de amonio hasta 740 ml de agua, introducir en autoclave, posteriormente adición de 200 ml de fosfato de potasio 1 M, pH 7,0 y 60 ml de solución de glucosa estéril al 50%), complementados con 5 g/l de β -alanina y 5 g/l de α -cetoisovalerato, títulos de ácido pantoténico de hasta 3,0 g/l (24 h).

5 La producción de la cepa PA221 de *Bacillus subtilis* (genotipo P₂₆panBCD, trpC2 (Trp⁻)) se describe en el párrafo siguiente:

Mediante métodos de ingeniería genética clásicos con ayuda de la información de secuencia del operón panBCD de *E. coli* (véase Merkel *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 143, 1996:247-252) partiendo de una biblioteca de plásmidos de *Bacillus subtilis* GP275 se clonó el operón panBCD de *Bacillus*. Para la clonación se utilizó la cepa BM4062 de *E. coli* (bir^{ts}) y la información de que el operón de *Bacillus* se encuentra en la proximidad del gen *birA*. El operón panBCD se insertó en un plásmido replicable de *E. coli*. Para la mejora de la expresión del operón panBCD se utilizaron promotores constitutivos fuertes del fago SP01 de *Bacillus subtilis* (P₂₆) y se sustituyó el sitio de unión al ribosoma (= RBS) antes del gen *panB* por un RBS artificial. Antes del casete P₂₆panBCD en el plásmido se ligó un fragmento de ADN, que se encuentra directamente en el sentido 5' del gen *panB* nativo en *Bacillus*. Este plásmido se transformó en la cepa RL-1 de *Bacillus subtilis* (derivado obtenido mediante mutagénesis clásica del *Bacillus subtilis* 168 (cepa de Marburg ATCC 6051), genotipo *trpC2* (Trp⁻)) y mediante recombinación homóloga se sustituyó el operón panBCD nativo por el operón P₂₆panBCD. La cepa resultante recibe el nombre de PA221 y tiene el genotipo P₂₆panBCD, *trpC2* (Trp⁻).

Con la cepa PA221 de *Bacillus subtilis* en cultivos de 10 ml con medio SVY, complementados con 5 g/l de β -alanina y 5 g/l de α -cetoisovalerato, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 0,92 g/l (24 h).

25 La producción de la cepa PA303 de *Bacillus subtilis* (genotipo P₂₆panE1) se describe en el párrafo siguiente:

Con ayuda de la secuencia génica *panE* de *E. coli* se clonó de manera análoga la secuencia *panE* de *Bacillus*. Se demostró, que en *B. subtilis* existen dos homólogos del gen *panE* de *E. coli*, que se denominaron *panE1* y *panE2*. Mediante análisis de delección se demostró, que el gen *panE1* es responsable del 90% de la producción de ácido pantoténico, mientras que la delección del gen *panE2* no tuvo ningún efecto significativo en la producción de ácido pantoténico. También aquí de manera análoga para la clonación del operón panBCD se sustituyó el promotor por el promotor constitutivo fuerte P₂₆ y el sitio de unión al ribosoma antes del gen *panE1* por el sitio de unión artificial. Se clonó el fragmento P₂₆panE1 en un vector, que estaba configurado de tal manera, que el fragmento P₂₆panE1 podía integrarse en el locus *panE1* original en el genoma de *Bacillus subtilis*. La cepa resultante tras la transformación y la recombinación homóloga recibe el nombre de PA303 y tiene el genotipo P₂₆panE1.

Con la cepa PA303 de *Bacillus subtilis*, en cultivos de 10 ml con medio SVY, complementados con 5 g/l de β -alanina y 5 g/l de α -cetoisovalerato, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 1,66 g/l (24 h).

La construcción de la cepa adicional tuvo lugar mediante la transformación de PA327 con un plásmido, que contenía el operón P₂₆ilvBNC y el gen marcador para espectinomicina. El operón P₂₆ilvBNC se integraba en el locus *amyE*, lo que pudo confirmarse mediante PCR. Un transformante se denominó PA340 (genotipo P₂₆panBCD, P₂₆panE1, P₂₆ilvBNC, specR, *trpC2* (Trp⁻)). Con la cepa PA340 de *Bacillus subtilis* en cultivos de 10 ml con medio SVY, complementados sólo con 5 g/l de β -alanina, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 3,6 g/l (24 h), en cultivos de 10 ml con medio SVY, complementados con 5 g/l de β -alanina y 5 g/l de α -cetoisovalerato, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 4,1 g/l (24 h).

Por lo demás se insertó en la cepa PA340 un casete *ilvD* desregulado. Para ello se transformó un plásmido, que contiene el gen *ilvD* bajo el control del promotor P₂₆ con el RBS2 artificial, en PA340. A este respecto se integró el gen P₂₆ilvD mediante recombinación homóloga en el locus *ilvD* original. La cepa PA374 resultante tiene el genotipo P₂₆panBCD, P₂₆panE1, P₂₆ilvBNC, P₂₆ilvD, specR y *trpC2* (Trp⁻). Con la cepa PA374 de *Bacillus subtilis* en cultivos de 10 ml con medio SVY, complementados sólo con 5 g/l de β -alanina, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 2,99 g/l (24 h).

Para producir con la cepa PA374 ácido pantoténico sin adición de β -alanina, se insertaron en la cepa PA374 copias adicionales del gen *panD* que codifica para la aspartato- α -descarboxilasa. Para ello se transformó ADN cromosómico de la cepa PA401 en PA374. Mediante la selección sobre tetraciclina se obtuvo la cepa PA377. La cepa PA377 resultante tiene el genotipo P₂₆panBCD, P₂₆panE1, P₂₆ilvBNC, P₂₆ilvD, specR, tetR y *trpC2* (Trp⁻).

Con la cepa PA377 de *Bacillus subtilis* en cultivos de 10 ml con medio SVY se consiguieron títulos de ácido pantoténico sin adición de precursores de hasta 1,31 g/l (24 h).

La producción de la cepa PA401 de *Bacillus subtilis* (genotipo P₂₆panD) se describe en el párrafo siguiente:

Se clonó el gen *panD* de *Bacillus subtilis* a partir del operón panBCD en un vector, que porta el gen marcador de tetraciclina. Antes del gen *panD* se clonaron el promotor P₂₆ y un RBS artificial descrito anteriormente. Mediante digestión de restricción se produjo un fragmento, que contenía el gen marcador de

ES 2 274 967 T3

tetraciclina y el gen *P₂₆panD*. Volvió a ligarse este fragmento y se transformó en la cepa PA221 mencionada anteriormente. A este respecto se integró el fragmento en el genoma de la cepa PA221. La cepa PA401 resultante tiene el genotipo *P₂₆panBCD*, *P₂₆panD*, *tetR* y *trpC2* (*Trp*⁻).

5 Con la cepa PA401 de *Bacillus subtilis*, en cultivos de 10 ml en medio SVY, complementados con 5 g/l de α -cetoisovalerato, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 0,3 g/l (24 h). En cultivos de 10 ml con medio SVY, complementados con 5 g/l de ácido D-pantoico y 10 g/l de L-aspartato, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 2,2 g/l (24 h).

10 Partiendo de la cepa PA377 se generó mediante la transformación con ADN cromosómico de la cepa PY79 una cepa prototrofa frente al triptófano. Esta cepa PA824 tiene el genotipo *P₂₆panBCD*, *P₂₆panEI*, *P₂₆ilvBNC*, *P₂₆ilvD*, *specR*, *tetR* y *Trp*⁺. Con la cepa PA824 de *Bacillus subtilis* en cultivos de 10 ml con medio SVY, se consiguieron títulos de ácido pantoténico sin adición de precursores de hasta 4,9 g/l (48 h) (Comparación con PA377: hasta 3,6 g/l en 48 h).

15 La producción de PA688 se describe en el párrafo siguiente:

Se clonó el gen *panB* de *Bacillus* a partir del operón *panBCD* de tipo natural y se insertó en un vector, que además de un gen de resistencia al cloranfenicol contiene también secuencias de *B. subtilis* del locus *vpr*.

20 El promotor constitutivo fuerte P26 se insertó antes del extremo 5' del gen *panB*. Se obtuvo un fragmento, que contiene el gen *P₂₆panB*, el gen marcador para la resistencia frente al cloranfenicol así como secuencias *vpr* de *Bacillus subtilis*, mediante digestión de restricción. Volvió a ligarse el fragmento aislado y con ello se transformó la cepa PA824. La cepa obtenida se denominó PA668. El genotipo de PA668 es: *P₂₆panBCD*, *P₂₆panEI*, *P₂₆ilvBNC*, *P₂₆ilvD*, *P₂₆panB*, *specR*, *tetR*, *CmR* y *Trp*⁺.

25 Se aislaron dos colonias de PA668 y una se denominó PA668-2A y la otra PA668-24.

30 Con la cepa PA668-2A de *B. subtilis*, en cultivos de 10 ml en medio SVY, sin la adición de precursores, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de 1,5 g/l en 48 h. En cultivos de 10 ml, complementados con 10 g/l de aspartato, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 5 g/l.

35 Con la cepa PA668-24 de *B. subtilis*, en cultivos de 10 ml en medio SVY, sin la adición de precursores, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de 1,8 g/l en 48 h. En cultivos de 10 ml, complementados con 10 g/l de L-aspartato, se consiguieron títulos de ácido pantoténico de hasta 4,9 g/l.

La construcción exacta de las cepas debe tomarse según los anexos de los documentos WO 01/21772 y US 2004/0091979.

40 Con la cepa PA377 descrita anteriormente con fermentación limitada en glucosa en medio SVY (25 g/l de caldo infusión de ternera de Difco, 5 g/l de extracto de levadura de Difco, 5 g/l de triptófano, 5 g/l de glutamato de Na, 2 g/l de (NH₄)₂SO₄, 10 g/l de KH₂PO₄, 20 g/l de K₂HPO₄, 0,1 g/l de CaCl₂, 1 g/l de MgSO₄, 1 g/l de citrato de sodio, 0,01 g/l de FeSO₄ x 7 H₂O y 1 ml/l de una solución salina de oligoelementos de composición siguiente: 0,15 g de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 2,5 g de H₃BO₃, 0,7 g de CoCl₂ x 6 H₂O, 0,25 g de CuSO₄ x 5 H₂O, 1,6 g de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,3 g de ZnSO₄ x 7 H₂O, llena con agua hasta 1 l) en la medida de 10 l con alimentación continua de una solución de glucosa en 36 h (48 h) se consiguieron concentraciones de ácido pantoténico en el caldo de fermentación de 18-19 g/l (22-25 g/l).

50 Con una fermentación limitada en glucosa de PA824, el derivado prototrofo frente a triptófano de PA377, en medio de extracto de levadura (10 g/l de extracto de levadura de Difco, 5 g/l de glutamato de Na, 8 g/l de (NH₄)₂SO₄, 10 g/l de KH₂PO₄, 20 g/l de K₂HPO₄, 0,1 g/l de CaCl₂, 1 g/l de MgSO₄, 1 g/l de citrato de sodio, 0,01 g/l de FeSO₄ x 7 H₂O y 1 ml/l de la solución salina de oligoelementos descrita anteriormente) en la medida de 10 l con alimentación continua de una solución de glucosa en 36 h, 48 h y 72 h se consiguen las concentraciones de ácido pantoténico siguientes en caldos de fermentación: 20 g/l, 28 g/l y 36 g/l.

55 Mediante una optimización de los medios adicional con la cepa PA824 con una fermentación limitada en glucosa en un medio que consiste en 10 g/l de extracto de levadura de Difco, 10 g/l de NZ Amine A (Quest International GmbH, Erfstadt), 10 g/l de glutamato de Na, 4 g/l de (NH₄)₂SO₄, 10 g/l de KH₂PO₄, 20 g/l de K₂HPO₄, 0,1 g/l de CaCl₂, 1 g/l de MgSO₄, 1 g/l de citrato de sodio, 0,01 g/l de FeSO₄ x 7 H₂O y 1 ml/l de la solución salina de oligoelementos descrita anteriormente en la medida de 10 l con alimentación continua de una solución de glucosa en 36 h (48 h) se consiguen las concentraciones de ácido pantoténico de 37 g/l (48 g/l) en caldos de fermentación. Aumentos adicionales de la concentración de ácido pantoténico en el caldo de fermentación son concebibles mediante optimización adicional de los medios, mediante aumento de la duración de la fermentación, mediante la mejora de la cepa y del procedimiento así como mediante combinaciones de las etapas individuales. Así pueden conseguirse las concentraciones de ácido pantoténico descritas anteriormente también mediante la fermentación de cepas, que son derivados de la PA824 descrita anteriormente. Los derivados pueden producirse mediante el desarrollo de la cepa clásico así como mediante manipulaciones de ingeniería genética adicionales. Mediante el desarrollo del procedimiento de fermentación, de los medios y de la cepa pueden aumentarse los títulos de ácido pantoténico en los caldos de fermentación hasta más de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y > 90 g/l.

Una ventaja esencial del procedimiento según la invención es que la fermentación se realiza en un medio de cultivo, que además de al menos una fuente de carbono y de nitrógeno como compuestos de partida no contiene otras etapas previas (precursores). Es decir la biosíntesis del ácido D-pantoténico es independiente de la alimentación de otros precursores. Por precursores de este tipo deben entenderse según la invención sustancias tales como por ejemplo β -alanina y/o L-aspartato y/o L-valina y/o α -cetoisovalerato y/o sus combinaciones. En una variante preferida del procedimiento según la invención se realiza la fermentación del microorganismo que produce ácido D-pantoténico en un medio de cultivo, que contiene una fuente de carbono y una de nitrógeno, pero que no se mezcla con ninguna β -alanina libre y/o sales de β -alanina o no se le añade en el transcurso de la fermentación. Es decir para la producción de ácido D-pantoténico en intervalos de al menos 10 g/l de medio de cultivo, preferiblemente de al menos 20 g/l, especialmente preferible de al menos 40 g/l, lo más especialmente preferible de al menos 60 g/l y especialmente de al menos 70 g/l, no se necesita según la invención ninguna alimentación de β -alanina libre y/o sales de β -alanina. La independencia de la alimentación de precursores representa especialmente una ventaja económica esencial del procedimiento según la invención con respecto a los procedimientos conocidos, dado que un gran número de precursores son muy caros.

Sin embargo la adición de β -alanina y/o sales de β -alanina no se descarta, de modo que en consecuencia puede mejorarse todavía adicionalmente el rendimiento de ácido D-pantoténico mediante la adición de β -alanina y/o sales de β -alanina. Si se parte por ejemplo de la base de que todos los precursores necesarios del ácido pantoténico están presentes en una cantidad suficiente y únicamente la actividad del gen panD limita un aumento adicional de la producción de ácido pantoténico, entonces puede aumentarse el rendimiento de ácido pantoténico por ejemplo en un 50% adicional mediante la adición de β -alanina libre y/o sales de β -alanina. En una variante ventajosa de la presente invención pueden añadirse hasta 20 g/l de β -alanina libre y/o sales de β -alanina al medio de cultivo para el aumento adicional del rendimiento de ácido pantoténico en más del 50%. Se prefiere la adición de aproximadamente 15 g/l de β -alanina libre y/o sales de β -alanina al medio de cultivo.

Ejemplos de fuentes de carbono adecuadas según la invención para su utilización en un medio de cultivo para la fermentación de los microorganismos mencionados anteriormente son azúcares, tales como hidrolizados de almidón (mono, di, oligosacáridos), preferiblemente glucosa o sacarosa así como melaza de remolacha o de caña de azúcar, proteínas, hidrolizados de proteína, harina de soja, agua empleada para remojar maíz, grasas, ácidos grasos libres, células recirculadas de fermentaciones ya realizadas o su hidrolizados así como extracto de levadura. Estas enumeraciones no son limitantes para la presente invención.

Además el presente procedimiento se caracteriza de manera ventajosa porque el contenido en azúcar total se reduce hasta un mínimo hasta el final de la fermentación, dado que de otra manera éste dificulta un secado posterior y/o formulación de la solución de fermentación por adhesión. Esto puede conseguirse según la invención porque la fermentación continúa realizándose todavía algún tiempo después de que se haya consumido la fuente de carbono (en el caso del cultivo en funcionamiento discontinuo) o después de interrumpir la alimentación de carbono (en el caso de una dirección del proceso en funcionamiento discontinuo con alimentación o discontinuo con alimentación repetida) y/o se regula de tal manera, que la concentración de la fuente de carbono prácticamente es cero (en el caso de una dirección del proceso discontinua con alimentación, discontinua con alimentación repetida o continua). Esto tiene lugar según la invención porque tras la interrupción de la dosificación de la fuente de carbono (por ejemplo solución de azúcar) continúa realizándose la fermentación hasta conseguir una concentración de oxígeno disuelto (pO_2) de al menos el 80%, preferiblemente del 90% y especialmente preferible del 95% del valor de saturación en la solución de fermentación.

Ejemplos de fuentes de nitrógeno adecuadas según la invención son amoníaco, sulfato de amonio, urea, proteínas, hidrolizados de proteína o extracto de levadura. Tampoco esta enumeración es limitante para la presente invención.

Además el medio de fermentación contiene sales minerales y/o oligoelementos, tales como aminoácidos y vitaminas. Las composiciones exactas de los medios de fermentación adecuados son muy conocidas y son accesibles para el experto. Tras la inoculación del medio de fermentación con un microorganismo adecuado que produce ácido D-pantoténico (con los espesores celulares conocidos por el experto) tiene lugar, dado el caso con la adición de un agente antiespumante, el cultivo del microorganismo. Una regulación dado el caso necesaria del valor de pH del medio puede tener lugar con diferentes ácidos o bases inorgánicas u orgánicas, tales como por ejemplo NaOH, KOH, amoníaco, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido succínico, ácido cítrico o similares.

Debido a los sistemas tampón utilizados durante la fermentación, que pueden ser tal como se describieron anteriormente, por ejemplo NaOH, KOH, amoníaco, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido succínico, ácido cítrico o similares, se encuentra el ácido D-pantoténico formado en la solución de fermentación según el sistema tampón utilizado en forma de (de las) sal(es) respectiva(s). Dado que a este respecto según la invención son desventajosas sobre todo las sales del ácido D-pantoténico en forma de sus cationes monovalentes o se prefiere sobre todo el ácido D-pantoténico en forma de sus sales de calcio o de magnesio, se trata la solución de fermentación según la invención mediante un procedimiento de separación por electromembrana.

A este respecto la presente invención comprende todos los tipos de procedimientos disponibles de separación por electromembrana, tales como las electrolisis de membrana o las electrodiálisis. Pertenece al conocimiento del experto hacer una selección adecuada. Según la invención se prefiere la utilización de la electrodiálisis. A este respecto se utilizan tanto electrodiálisis con membranas exclusivamente monopolares como electrodiálisis con membranas mono y/o bipolares. Especialmente se prefieren electrodiálisis con membranas exclusivamente monopolares, especialmente

electrodiálisis con membranas monopolares selectivas para iones monovalentes, las denominadas membranas monoselectivas. En principio, puede utilizarse cualquier membrana utilizada habitualmente en el contexto de los procedimientos de electrodiálisis para la realización del procedimiento según la invención. En el caso de la membrana utilizada en el contexto de la electrodiálisis según la invención, se utilizan preferiblemente membranas de intercambio iónico habituales en el comercio. Como membranas de intercambio aniónico que pueden usarse deben mencionarse por ejemplo: Neosepta AM1, AM2, AM3, AMX, AMH, AFN, de Tokuyama Corp. y AMV de Asahi Glass. Como membranas de intercambio catiónico deben mencionarse a modo de ejemplo Neosepta CM1, CM2, CMX, CMH, CMB, Asahi Glass CMV así como Nafion 435 o 350 de Du Pont de Nemours. Como membrana de intercambio catiónico monoselectiva debe mencionarse por ejemplo la membrana Neosepta CMS. Como membrana de intercambio aniónico monoselectiva se tienen en consideración por ejemplo las membranas Neosepta ACS de Tokuyama Corp. o Selmion ASV de Asahi Glass. Como electrodos pueden utilizarse aceros afinados, níquel, metales nobles tales como por ejemplo platino u otros materiales adecuados conocidos por el experto.

Mediante la utilización de la electrodiálisis monopolar, pueden conducirse según la invención tanto los aniones como los cationes de la solución que contiene pantotenato mediante la migración en el campo eléctrico por las membranas de intercambio aniónico o catiónico a una segunda solución (solución concentrada, CONC) y por consiguiente pueden eliminarse de la solución que contiene ácido pantoténico (solución de material diluido, DIL). De manera ventajosa, los iones de bajo peso molecular se eliminan según la invención de la solución que contiene ácido pantoténico. Por iones de bajo peso molecular se entienden aquéllos según la invención que se introducen mediante la composición del medio de cultivo y/o el sistema tampón en el caldo de fermentación, pero que no son deseables en el producto final. A este respecto, por ejemplo se trata de los siguientes iones: iones amonio, potasio, sodio, hierro, cloruro, fosfato o sulfato.

En una variante de realización adicional de la presente invención es posible realizar un intercambio iónico de cationes monovalentes, tales como iones Na^+ o amonio, por cationes polivalentes, tales como Ca^{2+} . Para esto se utilizan membranas de intercambio catiónico selectivas para iones monovalentes. Así, por ejemplo se coloca previamente una solución de CaCl_2 en un circuito I y la solución de ácido pantoténico que contiene los cationes monovalentes en un segundo circuito II separado del circuito I mediante una membrana de intercambio catiónico. Entonces, los cationes monovalentes preferiblemente se conducen hacia una tercera cámara III mediante una membrana de intercambio catiónico selectiva para iones monovalentes que se encuentra entre la cámara II y la cámara III. Simultáneamente, se conducen los aniones, tales como iones cloruro, de la cámara I a la cámara III mediante una membrana de intercambio aniónico que se encuentra entre la cámara I y la cámara III. Los iones Ca_2^+ se conducen de la cámara I a la cámara II mediante una membrana de intercambio catiónico. De esta manera se obtiene directamente el D-pantotenato de calcio. En el caso de que exista una sal de un ácido débil, tal como por ejemplo el ácido pantoténico, también puede obtenerse ácido D-pantoténico libre en un sistema de este tipo, si se coloca previamente una solución de HCl acuosa en vez de CaCl_2 en la cámara I.

Según la invención se comprende también la utilización de sales de calcio y/o de magnesio en forma de aniones inorgánicos u orgánicos. De manera ventajosa se usan según la invención cloruro, nitrato, hidróxido, formiato, acetato, propionato, glicinato o lactato de calcio y/o de magnesio.

En una variante de realización de la presente invención, pueden conducirse los cationes, en el caso de utilizar la electrodiálisis bipolar de manera ventajosa con la proporción simultánea de protones (mediante la disociación de agua en la membrana bipolar), de la solución que contiene pantotenato mediante las membranas de intercambio catiónico a una segunda solución y por consiguiente pueden eliminarse de la solución que contiene ácido pantoténico. En la segunda solución se forman las correspondientes bases de los cationes que se conducen con los iones hidróxido proporcionados en la membrana bipolar mediante la disociación de agua.

En otra forma de realización de la presente invención, pueden conducirse los aniones, en el caso de utilizar la electrodiálisis bipolar de manera ventajosa con la proporción simultánea de iones hidróxido (mediante la disociación de agua en la membrana bipolar), de la solución que contiene pantotenato a una segunda solución mediante la membrana de intercambio aniónico y por consiguiente pueden eliminarse de la solución que contiene ácido pantoténico. En la segunda solución se forman los correspondientes ácidos de los aniones que se conducen con los protones proporcionados en la membrana bipolar mediante la disociación de agua.

Según la invención se comprende también una variante de realización adicional en la que por un lado los aniones mediante la utilización de la electrodiálisis bipolar con la proporción simultánea de iones hidróxido (mediante la disociación de agua en la membrana bipolar) se conducen de la solución que contiene pantotenato a una segunda solución mediante una membrana de intercambio aniónico y por consiguiente se eliminan de la solución que contiene ácido pantoténico y por otro lado los cationes con la proporción simultánea de protones (mediante la disociación de agua en la membrana bipolar) se conducen de la solución que contiene pantotenato a una tercera solución mediante la membrana de intercambio catiónico y por consiguiente se eliminan de la solución que contiene ácido pantoténico. En la segunda solución se forman los correspondientes ácidos de los aniones que se conducen con los protones proporcionados en la membrana bipolar mediante la disociación de agua y en la tercera solución se forman las correspondientes bases de los cationes que se conducen con los iones hidróxido proporcionados en la membrana bipolar mediante la disociación de agua.

ES 2 274 967 T3

Según la invención se prefiere además, en el caso del presente procedimiento, el ajuste del valor de pH de la solución que contiene pantotenato, hasta el punto isoeléctrico del ácido pantoténico con ayuda de ácidos o bases. Debido a eso, el rendimiento del ácido D-pantoténico libre puede aumentarse más o la pérdida puede minimizarse.

5

La electrodiálisis monopolar es una variante especialmente preferida, dado que es muy económica en comparación con la electrodiálisis bipolar.

Entonces, la electrodiálisis bipolar es apropiada especialmente si los ácidos o bases no deben añadirse para el ajuste del valor de pH o si puede reutilizarse el ácido o base producido.

10

Todas las variantes de electrodiálisis ofrecen según la invención la ventaja de que no presentan agua residual a partir de la regeneración de las resinas de intercambio iónico.

15

Mediante la utilización según la invención del procedimiento de separación de electrones preferiblemente se eliminan los iones de bajo peso molecular no deseados (iones extraños), tales como iones amonio, potasio, sodio, hierro, cloruro, fosfato o sulfato, de la solución que contiene D-pantotenato. Es decir, se produce(n) preferiblemente ácido D-pantoténico libre o las sales deseadas, tales como D-pantotenato de calcio y/o de magnesio. Según la invención se reduce el contenido en cationes monovalentes, preferiblemente iones amonio, potasio y/o sodio, hasta una concentración de ≤ 1 g/kg de solución.

20

También puede reducirse esencialmente el contenido en aniones no deseados, tales como por ejemplo iones cloruro, sulfato o fosfato, mediante la elección de la membrana de intercambio iónico, preferiblemente mediante la utilización de una membrana de intercambio aniónico.

25

La disolución así obtenida que contiene ácido D-pantoténico libre se ajusta según la invención mediante la adición de bases de calcio y/o de magnesio hasta un valor de pH de 3-10. De manera ventajosa es un valor de pH de 5-10. Se prefiere el ajuste del valor de pH hasta un valor de 5-9, especialmente preferible de 6-9 y muy especialmente preferible de 6-8. De esta manera se obtiene una solución que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio. Preferiblemente, se le añade a la solución para la neutralización hidróxido de calcio, carbonato de calcio, óxido de calcio, hidróxido de magnesio y/o carbonato de magnesio básico en forma de un sólido y/o como suspensión acuosa. A este respecto, se prefiere según la invención, si la neutralización de la solución que contiene ácido D-pantoténico libre tiene lugar con ayuda de una base de calcio y/o de magnesio en forma de una suspensión acuosa. Mediante la utilización de una dispersión acuosa, la neutralización tiene lugar más rápidamente y sin grandes fluctuaciones de pH como es el caso de la utilización de un sólido correspondiente.

30

35

Según la invención el procedimiento se caracteriza porque se añade a la solución en la etapa c) una suspensión acuosa que contiene el 2-55% en peso, preferiblemente el 10-50% en peso y especialmente preferible el 20-40% en peso de hidróxido de calcio. Según la invención se comprende además un procedimiento, en el que se añade a la solución en la etapa c) una suspensión acuosa que contiene el 2-65% en peso, preferiblemente el 10-50% en peso y especialmente preferible el 20-40% en peso de carbonato de calcio. En una variante de realización adicional de la presente invención se añade a la solución en la etapa c) del procedimiento según la invención, una suspensión acuosa que contiene el 2-60% en peso, preferiblemente el 10-50% en peso y especialmente preferible el 20-40% en peso de hidróxido de magnesio. Según la invención se comprende también un procedimiento, añadiéndose a la solución en la etapa c) una suspensión acuosa que contiene el 2-25% en peso, preferiblemente el 10-20% en peso de carbonato de magnesio básico.

40

45

El secado y/o la formulación de la solución de fermentación tiene lugar según procedimientos en sí conocidos, tal como por ejemplo el secado por pulverización, la granulación por pulverización, el secado en lecho fluidizado, la granulación en lecho fluidizado, el secado de tambor o el secado spin-flash (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª edición, 1999, versión electrónica, capítulo "Drying of Solid Materials"). La temperatura de entrada de gas en el caso del secado por convección se encuentra en el intervalo de 100-280°C, preferiblemente a 120-210°C. La temperatura de salida de gas se encuentra a 50-180°C, preferiblemente a 60-150°C. Para el ajuste de una distribución del tamaño de partícula deseado y de las propiedades del producto relacionadas con ello pueden separarse o recircularse partículas finamente divididas. Además, puede molerse la partícula gruesa en una molidora y también posteriormente recircularse.

50

55

Según la invención es ventajosa en el caso del procedimiento presentado anteriormente la reducción de las etapas costosas, especialmente prescindir de la utilización de disolventes orgánicos, con la proporción simultánea de un producto deseado con buena valencia biológica. Además, según la invención se reduce esencialmente la cantidad en agua residual que se produce. Por consiguiente, esto da como resultado ahorros adicionales en las instalaciones y plantas de eliminación costosas. Por consiguiente, el procedimiento según la invención se caracteriza de manera ventajosa porque es más sencillo, menos propenso a averías, de menor consumo de tiempo, claramente con menor coste y por tanto más económico, que los procedimientos habituales.

60

65

Sin embargo, esto no excluye que pueda variarse el procedimiento según la invención. Las etapas del procedimiento a) hasta d) según la invención mencionadas anteriormente, pueden complementarse mediante una o más de las etapas de procedimiento siguientes, que por sí mismas son familiares para el experto. A este respecto, se comprenden según

ES 2 274 967 T3

la invención todas las combinaciones concebibles de las etapas de procedimiento adicionales (facultativas) con las etapas del procedimiento a) hasta d) (esenciales).

5 Así, las soluciones que resultan a partir de las etapas del procedimiento a)-c) pueden esterilizarse por ejemplo mediante calentamiento (esterilización) u otros métodos, tales como por ejemplo pasteurización o filtración esterilizante.

10 En una variante adicional del procedimiento según la invención antes del secado y/o de la formulación de la solución, puede realizarse al menos una y/o combinaciones de las etapas siguientes, que comprenden lisar y/o provocar la muerte de la biomasa y/o separar la biomasa de la solución de fermentación y/o añadir aditivos adicionales y/o concentrar la solución de fermentación, preferiblemente mediante deshidratación.

15 Por consiguiente, también es objeto de la presente invención un procedimiento realizándose la lisis y/o la provocación de la muerte de la biomasa ya en la solución de fermentación o no hasta que se produce la separación de la biomasa de la solución de fermentación. Esto puede tener lugar por ejemplo mediante un tratamiento de temperatura, preferiblemente a 80-200°C y/o un tratamiento ácido, preferiblemente con ácido sulfúrico o ácido clorhídrico y/o enzimático, preferiblemente con lisozima.

20 En una forma de realización adicional de la presente invención pueden eliminarse las células de los microorganismos que fermentan mediante la filtración, separación (por ejemplo centrifugación) y/o decantación de las soluciones de las etapas a), b) o c) del procedimiento según la invención. También es concebible que las etapas a), b) o c) pueden conducirse sin la separación de los microorganismos que están contenidos directamente mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de una o varias membranas selectivas de iones.

25 La solución que resulta a partir del tratamiento a través de la electrolisis de membrana o electrodiálisis puede concentrarse a continuación de la neutralización a través de un concentrador adecuado, por ejemplo evaporador de película descendente, evaporador de película delgada o evaporador de rotación. Concentradores de este tipo se producen por ejemplo por las empresas GIG (4800 Attnang Puchheim, Austria), GEA Canzler (52303 Düren, Alemania), Diessel (31103 Hildesheim, Alemania) y Pitton (35274 Kirchhain, Alemania).

30 Para mejorar las propiedades de color del producto final, puede realizarse una etapa de filtración adicional, en la que se añaden algo de carbón activado a las soluciones obtenidas durante el procedimiento y posteriormente se filtra esta suspensión. O pueden conducirse las soluciones obtenidas durante la fermentación a través de un lecho de carbón activado. Las cantidades necesarias para esto de carbón activado que se utiliza se encuentran en el intervalo inferior al % en peso de la solución y se encuentran en el conocimiento y cálculo del experto. Estas filtraciones pueden facilitarse mientras añadiendo a cada solución antes de la filtración un agente auxiliar de floculación habitual en el comercio (por ejemplo Sedipur CF 902 o Sedipur CL 390 de la empresa BASF AG, Ludwigshafen).

35 En una forma de realización ventajosa de la presente invención se esteriliza el producto de salida de la fermentación (caldo de fermentación) mediante calentamiento y entonces se libera de la masa celular mediante centrifugación, filtración o decantación. Tras la adición de 50-1000 mg/kg, preferiblemente de 100-200 mg/kg de un agente auxiliar de floculación habitual en el comercio con respecto al producto de salida de la fermentación, se filtra a través de lecho corto de carbón activado y arena, para obtener una solución libre de biomasa con alto contenido en ácido D-pantoténico. Posteriormente se desplaza esta solución tratada mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de una o varias membranas selectivas de iones.

45 El secado posterior de esta solución puede tener lugar por ejemplo mediante secado por pulverización. Este puede tener lugar en equicorriente, en contracorriente o corriente mixta. Para la pulverización puede recurrirse a todos los pulverizadores conocidos, especialmente el pulverizador centrífugo (pulverizador de disco), tobera para sustancia única y tobera para dos sustancias. Preferiblemente las condiciones de temperatura de secado son de 150-250°C de temperatura de entrada a la torre y de 70-130°C de temperatura de salida de la torre. Pero también puede secarse a un nivel de temperatura mayor o menor. Para generar una humedad residual muy baja, puede conectarse a continuación incluso una etapa de secado adicional en un lecho fluidizado.

55 El secado por pulverización puede realizarse también en una secadora FSD o SBD (FSD: Fluidized Spray dryer (secadora de pulverización fluidizada); SBD: Spray Bed Dryer (secadora de lecho de pulverización), tal como se construyen por las empresas Niro (Copenhague, Dinamarca) y APV-Anhydro (Copenhague, Dinamarca), que representan un combinación de secadora por pulverización y lecho fluidizado. En el caso del secado por pulverización puede añadirse un fluidificante. Debido a esto pueden reducirse las capas en las paredes de la secadora y mejorarse las propiedades del flujo, justamente en el caso de polvos de grano fino. Como fluidificantes se tienen en consideración especialmente silicatos, estearatos, fosfatos y almidón de maíz. En principio, el secado también puede tener lugar en un lecho fluidizado por pulverización, pudiéndose realizarse tanto de manera continua como discontinua. La pulverización de la solución puede tener lugar tanto por la parte superior (pulverización superior), por la parte inferior (pulverización inferior) como por los lados (pulverización lateral).

65 Es además objeto de la presente invención una composición para su utilización como aditivo de alimento para animales y/o como complemento de alimento para animales, pudiéndose producirse

ES 2 274 967 T3

- 5 a) utilizando al menos un microorganismo que produce ácido D-pantoténico, cuya biosíntesis de ácido pantoténico (pan) y/o de isoleucina/valina (ilv) está desregulada y que forma al menos 2 g/l de sales del ácido D-pantoténico mediante la fermentación en un medio de cultivo, añadiéndose al medio de cultivo 0-20 g/l, preferiblemente 0 g/l de β -alanina libre y/o sal de β -alanina,
- 10 b) conduciendo la solución de fermentación que contiene D-pantotenato mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de una o varias membranas selectivas de iones, eliminándose los iones de bajo peso molecular de la solución que contiene D-pantotenato,
- 15 c) ajustándose el ácido D-pantoténico libre contenido en la solución mediante la adición de una base de calcio y/o de magnesio hasta un valor de pH de 3-10, obteniéndose una solución, que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio y
- d) sometiendo la solución que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio a un secado y/o formulación.

En una variante de la presente invención, la composición se caracteriza porque se obtiene o se coloca previamente una suspensión en la etapa c) o d), que contiene el pantotenato de calcio y/o de magnesio.

Según la invención la composición se caracteriza además porque contiene sales del ácido D-pantoténico en una concentración de al menos el 1-100% en peso, preferiblemente de al menos el 20-100% en peso y especialmente preferible de al menos el 50% en peso. Es objeto de la presente invención una composición, que contiene sales del ácido D-pantoténico en forma de cationes bivalentes, preferiblemente D-pantotenato de calcio y/o de magnesio. Según la invención se prefiere una composición que se caracteriza porque el contenido en sales del ácido D-pantoténico en forma de cationes monovalentes es ≤ 1 g/kg.

Según la invención se obtiene mediante el procedimiento descrito anteriormente un D-pantotenato de calcio o de magnesio, que satisface las exigencias para un aditivo de alimento para animales. Estos requisitos son por ejemplo un contenido relativamente alto en D-pantotenato y una buena tolerancia para los organismos objetivo así como una valencia biológica en el sentido de "acción de vitamina" del producto según la invención.

La presente invención se explica más detalladamente mediante los ejemplos siguientes, que sin embargo no son limitantes para la invención:

Ejemplo 1

Se colocó previamente en un fermentador de laboratorio con agitador y dispositivo de gasificación con 14 l de contenido un medio de fermentación acuoso con la siguiente composición:

Sustancia utilizada	Concentración [g/l]
Extracto de levadura	10
Glutamato de sodio	5
Sulfato de amonio	8
antiespumante	1 ml/l

Tras la esterilización se añadieron adicionalmente los siguientes componentes de los medios estériles:

Sustancia utilizada	Concentración [g/l]
KH_2PO_4	10
K_2HPO_4	20
Glucosa	2,5
Cloruro de calcio	0,1
Cloruro de magnesio	1
Citrato de sodio	0,1
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1
Solución salina de oligoelementos	1 ml/l

ES 2 274 967 T3

La solución salina de oligoelementos se compone tal como sigue:

5 0,15 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g de H_3BO_3 , 0,7 g de $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 1,6 g de $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g de $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ se rellenan con agua hasta 1 litro. La adición de la solución salina de oligoelementos tiene lugar mediante una filtración esterilizante. El volumen de líquido inicial asciende a 8,4 l. Los contenidos mencionados anteriormente se refieren a este valor.

10 Se añadieron a esta solución 160 ml de cultivo inoculante (OD = 10 en medio SVY (esterilizar el medio SVY: 25 g caldo infusión de ternera de Difco, 5 g de extracto de levadura de Difco, 5 g de glutamato de sodio, 2,7 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 740 ml de H_2O ; añadir 200 ml de K_2HPO_4 1 M (pH 7) estéril y 60 ml de solución estéril de glucosa al 50% (volumen final 1 l)) de *Bacillus subtilis* PA824 y se fermentó a 43°C con agitación fuerte a una velocidad de gasificación de 12 l/min. Se describe esta cepa según el anexo en el documento WO 01/21772.

15 Se dosificaron 6 l de una solución acuosa estéril en el plazo de 52 h. La composición fue:

Sustancia utilizada	Concentración [g/l]
Glucosa	500
Cloruro de calcio	0,6
Solución salina de oligoelementos	7 ml/l

20 Se llevó a cabo la fermentación limitada en glucosa. Durante la fermentación se mantuvo el valor de pH a 7,2 mediante la dosificación de solución de amoníaco al 25% o de ácido fosfórico al 20%. El amoníaco sirve simultáneamente como fuente de nitrógeno para la fermentación. Se reguló el número de revoluciones del elemento agitador, manteniendo el contenido en oxígeno disuelto al 30% del valor saturación. Se controló la formación de espuma mediante dosificaciones ocasionales de un agente antiespumante. Tras la interrupción de la dosificación de la fuente de carbono se continuó tanto la fermentación, hasta que el contenido en oxígeno disuelto ($p\text{O}_2$) hubo alcanzado un valor del 95% del valor de saturación. Posteriormente, se finalizó la fermentación y se provocó la muerte térmicamente del microorganismo. Para ello se esterilizó la solución de fermentación durante 60 min. Se comprobó la muerte mediante siembra. A continuación tiene lugar la separación celular mediante centrifugación. Tras la separación celular, la concentración de D-pantotenato tras 52 h asciende a 24,7 g/l.

35 De manera análoga, también pueden producirse caldos de fermentación, que presentan títulos de ácido pantoténico libre de alimentación de β -alanina superiores a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y > 90 g/l.

40 Un producto de salida de la fermentación, que tal como se describió anteriormente se esterilizó mediante calentamiento y se liberó considerablemente de la biomasa mediante la centrifugación, se mezcló con ácido D-pantoténico adicional y se ajustó el valor de pH con ácido sulfúrico a aproximadamente 2. Se filtró la solución obtenida de este modo sobre un lecho pequeño de arena/carbón activado. El contenido en ácido D-pantoténico en esta solución asciende a 67,7 g/l.

45 Se trataron con electrodiálisis 900 g de este filtrado tal como sigue: en una célula de electrodiálisis (provista de membranas intercambiadoras de cationes y aniones (de los tipos Neosepta AMX Sb o CMX Sb de Tokuyama Corp.) con una superficie celular eficaz de 1,85 dm² y cinco cámaras, se desalinizó el filtrado con una densidad de corriente inicial de 29 mA/cm². La densidad de corriente se redujo en el transcurso del ensayo tras alcanzar la tensión límite preestablecida de 20 V de manera continua. La temperatura estaba entre 33°C y 40°C. Se colocó previamente como entrada de concentrados una solución de NaCl al 0,5% (p/p). Se reconcentró este concentrado (CONC) en el transcurso del ensayo con los iones extraños eliminados del filtrado (material diluido, DIL) (por ejemplo iones amonio, cloruro, hierro, potasio, sodio o fosfato). Se colocó previamente en el circuito de electrolitos solución de sulfato de sodio al 5% (p/p) para la limpieza de los electrodos. Se retiraron y analizaron en el transcurso del ensayo a distintos valores de conductividad iónica de la solución de material diluido muestras de la cámara que contiene el material diluido. Se representa el análisis en la siguiente tabla y dio como resultado que se eliminan del material diluido los iones mencionados con la duración progresiva del ensayo y se redujo correspondientemente la conductividad del material diluido. Los iones pequeños, monovalentes, tales como por ejemplo los iones cloruro, se eliminan más rápidamente que los iones voluminosos, polivalentes, tales como por ejemplo, los iones fosfato.

60 Los resultados del análisis del material diluido pueden tomarse de la siguiente tabla.

65

		Iones (análisis del laboratorio de investigación)							
	APT g/l	Amonio	Cl	o-fosfato	Ca	Fe	K	Mg	Na
Educto (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 final	76,0	0,01%	<0,01%	0,21%	<0,001%	<0,001%	0,009%	<0,001%	0,010%
APT = ácido pantoténico									

Los valores de pH de todas las muestras del material diluido estaban entre 2-3. En 771 g del producto de salida del material diluido están contenidos 76 g/l de ácido D-pantoténico libre. Con esto se muestra que puede liberarse con éxito de manera electrolítica una solución de ácido D-pantoténico obtenida de manera fermentativa de cationes interferentes. A partir del ácido D-pantoténico desalinizado obtenido pueden producirse un polvo de D-pantotenato de calcio no higroscópico, tal como se describe en el ejemplo 2.

ES 2 274 967 T3

Ejemplo 2

Se colocó en un fermentador de laboratorio con agitador y dispositivo de gasificación con 14 l de contenido un medio de fermentación acuoso con la siguiente composición:

Sustancia utilizada	Concentración [g/l]
Extracto de levadura	10
Glutamato de sodio	5
Sulfato de amonio	8
KH ₂ PO ₄	8,4
K ₂ HPO ₄	15

Tras la esterilización se añadieron adicionalmente los siguientes componentes de los medios:

Sustancia utilizada	Concentración [g/l]
Glucosa	2,5
Cloruro de calcio	0,1
Cloruro de magnesio	1
Citrato de sodio	1
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01
Solución salina de oligoelementos	1 ml

La solución salina de oligoelementos se compone tal como sigue:

0,15 g de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 2,5 g de H₃BO₃, 0,7 g de CoCl₂ x 6 H₂O, 0,25 g de CuSO₄ x 5 H₂O, 1,6 g de MnCl₂ x 4 H₂O, 0,3 g de ZnSO₄ x 7 H₂O se rellenan con agua hasta un litro. La adición de la solución salina de oligoelementos tiene lugar mediante una filtración esterilizante. El volumen de líquido inicial asciende a 5,5 l. Los contenidos mencionados anteriormente se refieren a este valor.

Se añadieron a esta solución 55 ml de cultivo inoculante (OD = 10 en medio SVY (esterilizar el medio SVY: disolver 25 g de caldo infusión de ternera de Difco, 5 g de extracto de levadura de Difco, 5 g de glutamato de sodio, 2,7 g de (NH₄)₂SO₄ en 740 ml de H₂O; añadir 200 ml de K₂HPO₄ 1 M (pH 7) estéril y 60 ml de solución estéril de glucosa al 50% (volumen final 1 l))) de *Bacillus subtilis* PA824 y se fermentó a 43°C con agitación fuerte a una velocidad de gasificación de 12 l/min. Se describe esta cepa según el anexo en el documento WO 01/21772.

Se dosificaron 6 l de una solución acuosa estéril en el plazo de 48 h. La composición fue:

	APT [g/l]	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺
Producto 5329/01/82 en t = 0	9,27	0,24%	0,15%	0,65%	0,24%
Producto 5329/01/82 en t = 0,83 h	9,01	0,43%	0,07%	0,25%	0,06%
Concentrado 5329/01/82 en t = 0 h	0,0	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%
Concentrado 5329/01/82 en t = 0,83 h	0,015	0,02%	0,47%	0,71%	0,29%

Se llevó a cabo la fermentación limitada en glucosa. Durante la fermentación se mantuvo el valor de pH a 7,2 mediante la dosificación de solución de amoníaco al 25% o de ácido fosfórico al 20%. El amoníaco sirve simultáneamente como fuente de nitrógeno para la fermentación. Se reguló el número de revoluciones del elemento agitador, manteniendo el contenido en oxígeno disuelto al 30% del valor saturación. Se controló la formación de espuma mediante dosificaciones ocasionales de un agente antiespumante. Tras la interrupción de la dosificación de la fuente de carbono se continuó tanto la fermentación, hasta que el contenido en oxígeno disuelto (pO₂) hubo alcanzado un valor del 95% del valor de saturación. Posteriormente, se finalizó la fermentación y se provocó la muerte térmicamente del microorganismo. Para ello se esterilizó la solución de fermentación durante 30 min. Se comprobó la muerte mediante siembra. La separación celular tuvo lugar mediante centrifugación. Tras la separación celular la concentración en D-patotenato tras 48 h, ascendió a 24,1 g/l. De una manera análoga, también pueden producirse caldos de fermentación, que presentan títulos de ácido pantoténico libre de alimentación de β-alanina superiores a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y > 90 g/l. Se mezclaron 2817 ml del producto de salida de la fermentación con 1183 ml

ES 2 274 967 T3

de una solución de ácido pantoténico de la concentración de 178,9 g/l y se neutralizó con una solución de hidróxido de amonio al 25% (pH 6,5). A continuación se filtró sobre arena/carbón activado. El contenido en ácido D-pantoténico en el filtrado ascendió a 67 g/l, principalmente en forma de la sal de amonio. Se trataron con electrodiálisis aproximadamente 720 g de esta solución según el ejemplo 1:

5

Se ajustaron a un valor de pH de 7,5 550 g del producto de salida del material diluido (con una densidad de 1,017 g/ml) con 3,5 g de una suspensión de hidróxido de calcio al 40%. Se obtuvo una solución acuosa de D-pantotenato de calcio (551,03 g con un contenido en D-pantotenato de calcio de 40,9 g/l). Se secó la solución acuosa de pantotenato de calcio en un secador por pulverización de laboratorio de la empresa Niro, tipo Minor. La temperatura de entrada en la torre ascendió aproximadamente a 200°C, la temperatura de salida de la torre a 90°C. La vaporización tuvo lugar por medio de una tobera de dos sustancias a una presión de 2 bar. Como medio de pulverización se añadió Sipemat 22F. A este respecto se obtuvo un producto pulverizado de la siguiente especificación (datos en % en peso):

15

Contenido en agua: 2,3%

D-pantotenato de calcio: 46,1%

Amonio: 0,60%

20

Potasio: 0,47%

Sodio: 1,1%

Ejemplo 3

25

Se mezclaron en un fermentador con agitador y dispositivo de gasificación 800 g de extracto de levadura al 50%, 438 g de glutamato de Na, 3200 g de harina de soja, 640 g de sulfato de amonio, 800 g de KH_2PO_4 , 1600 g de K_2HPO_4 y 50 ml de agente antiespumante TegoKS con 70 l de agua con 200 litros de contenido y se esterizaron durante 30 min a 121°C.

30

A continuación se añadieron la solución 1 y la solución 2.

La solución 1 se prepara tal como sigue: se disuelven en 9 l de agua 1670 g de glucosa x H_2O , 10,2 g de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ y 170,7 g de $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ y se esterilizan durante 30 min.

35

La solución 2 se prepara tal como sigue: se mezclaron 800 ml de solución de citrato-hierro (200 g/l de citrato de sodio, 2 g/l de $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, sometida a filtración esterilizante) con 80 ml de solución salina de oligoelementos (0,15 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g de H_3BO_3 , 0,7 g de $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 1,6 g de $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g de $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ se rellenan con agua hasta un litro, sometida a filtración esterilizante).

40

Se añadieron a esta solución 2 l de cultivo inoculante (OD = 10 en medio SVY (esterilizar el medio SVY: 25 g de caldo infusión de ternera de Difco, 5 g de extracto de levadura de Difco, 5 g de glutamato de sodio, 2,7 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 740 ml de H_2O ; añadir 200 ml de K_2HPO_4 1 M (pH 7) estéril y 60 ml de solución estéril de glucosa al 50% (volumen final 1 l)) de *Bacillus subtilis* PA668 y se fermentó a 43°C con agitación fuerte a una velocidad de gasificación de 3 m³/min. Se describe esta cepa según el anexo en el documento US 2004/0091979.

45

Se dosificaron aproximadamente 10 l de una solución acuosa estéril de glucosa en el plazo de 48 h. La solución se preparó tal como sigue: se mezclaron 90 kg de glucosa x H_2O con 55 kg de agua y se esterizaron durante 30 min. A continuación se añadieron 300 ml de solución salina de oligoelementos (véase la composición más arriba) así como 3 l de solución de citrato-hierro (véase la composición más arriba). A continuación se añadieron 11 de solución de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ de 90 g/l sometida a filtración esterilizante así como 2 l de solución de glutamato de sodio de 375 g/l sometida a filtración esterilizante.

50

Se llevó a cabo la fermentación limitada en glucosa. Durante la fermentación se mantuvo el valor de pH a 7,2 mediante la dosificación de solución de amoniaco al 25% o de ácido fosfórico al 20%. El amoniaco sirve simultáneamente como fuente de nitrógeno para la fermentación. Se reguló el número de revoluciones del elemento agitador, manteniendo el contenido en oxígeno disuelto al 30% del valor saturación. Se controló la formación de espuma mediante dosificaciones ocasionales de un agente antiespumante. Tras la interrupción de la dosificación de la fuente de carbono se continuó tanto la fermentación, hasta que el contenido en oxígeno disuelto (pO_2) hubo alcanzado un valor del 95% del valor de saturación. Posteriormente, se finalizó la fermentación. La separación celular tuvo lugar mediante la separación en un separador de discos. Se provocó la muerte de las células restantes en el líquido sobrenadante, térmicamente, mediante esterilización. La concentración en D-pantotenato en la interrupción tras 48 h ascendió a 13,7 g/l. Tras la separación y la esterilización la concentración en D-pantotenato ascendió a 10,7 g/l. De, manera análoga, también pueden producirse caldos de fermentación, que presentan títulos de ácido pantoténico libre de alimentación de β -alanina superiores a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y superiores a 90 g/l.

65

Se procedió con 3000 g de la solución de fermentación así tratada previamente tal como sigue a continuación: dos tercios de la mezcla básica se mezclaron a aproximadamente 10°C con una cantidad de CaCl_2 correspondiente a la

ES 2 274 967 T3

concentración equivalente en aniones polivalentes (solución al 40%); se hace precipitar un tercio de la mezcla básica de manera correspondiente con una cantidad equivalente en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (sólido). Se almacenaron las soluciones durante toda la noche en el frigorífico y después se separaron por medio de un filtro a presión y vacío (filtro de lecho profundo 700 de Seitz) del cuerpo base precipitado. Posteriormente se mezclaron las soluciones y se ajustaron de manera básica mediante adición de 10 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ adicionales a aproximadamente 10°C ($\text{pH} = 8,7$) y se volvieron a precipitar. Asimismo se separó por filtración el precipitado vuelto a precipitar.

Después se transformaron las sales de 1800 g de la solución a 35°C en una memoria de retención temporal de electrodiálisis de tres compartimentos. A este respecto se condujo el caldo de fermentación a través de una de las dos cámaras de productos limitadas por las membranas de intercambio catiónico. En la parte catódica una membrana de intercambio catiónico monoselectiva (Tokuyama Soda, CMS) separó el producto del circuito del concentrado, en la parte del ánodo se separó la cámara de productos de una membrana de intercambio catiónico convencional (Tokuyama Soda, CMS) del circuito del CaCl_2 . El concentrado y el circuito del CaCl_2 se separaron a través de una membrana de intercambio aniónico (Tokuyama Soda, AMX). En el concentrado se colocaron previamente 750 g de una solución de NaCl al 0,5%, en el circuito de CaCl_2 900 g de una solución de CaCl_2 al 3,05%. En el circuito de lavado de los electrodos se hizo circular una solución de Na_2SO_4 0,1 molar. El ensayo se llevó a cabo de manera galvanostática a 30 mA/cm^2 en una memoria de retención temporal constituida por cinco de las unidades fundamentales descritas anteriormente con una superficie de membrana total de 500 cm^2 en funcionamiento discontinuo. Como criterio de interrupción se eligió una conductividad mínima de 4 mS/cm en el circuito de CaCl_2 . Los resultados de los análisis de los cationes en el circuito del concentrado y el producto se resumen en la siguiente tabla.

	APT [g/l]	Ca^{2+}	Na^+	K^+	NH_4^+
Producto 5329/01/82 en $t = 0$	9,27	0,24%	0,15%	0,65%	0,24%
Producto 5329/01/82 en $t = 0,83 \text{ h}$	9,01	0,43%	0,07%	0,25%	0,06%
Concentrado 5329/01/82 en $t = 0 \text{ h}$	0,0	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%
Concentrado 5329/01/82 en $t = 0,83 \text{ h}$	0,015	0,02%	0,47%	0,71%	0,29%

De ahí se calculan enriquecimientos del 51% para sodio, 66% para amonio y 61% para potasio. El rendimiento de corriente medio ascendió al 82%. La pérdida de ácido pantoténico en ambos circuitos contiguos fue respectivamente del 0,08% de la cantidad de materia utilizada. El valor de pH del circuito de producto fue en el transcurso de la pérdida entre $\text{pH} = 7-7,5$, en el concentrado y en el circuito de CaCl_2 de aproximadamente $\text{pH} = 6$. El residuo de tensión total aumentó a lo largo del ensayo correspondientemente a la conductividad decreciente en el circuito de CaCl_2 de aproximadamente 11 a 16 V.

A continuación se secó por pulverización la solución así tratada por electrodiálisis con éxito para dar el producto final. Con esto se muestra que con el pretratamiento correspondiente puede utilizarse una electrodiálisis en tres circuitos con una membrana de intercambio catiónico monoselectiva para el intercambio de iones de cationes monovalentes por divalentes, para aumentar la capacidad de secado por pulverización del producto final.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de ácido D-pantoténico y/o sus sales, **caracterizado** porque

5 e) se utiliza al menos un microorganismo que produce ácido D-pantoténico, cuya biosíntesis de ácido pantoténico (pan) y/o de isoleucina/valina (ilv) está desregulada y que forma al menos 2 g/l de sales del ácido pantoténico mediante la fermentación en un medio de cultivo, añadiéndose al medio de cultivo 0 - 20 g/l de β -alanina libre y/o sal de β -alanina,

10 f) se conduce la solución de fermentación que contiene D-pantotenato mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de una o varias membranas selectivas de iones, eliminándose los iones de bajo peso molecular de la solución que contiene D-pantotenato,

15 g) se ajusta el ácido D-pantoténico libre contenido en la solución mediante la adición de una base de calcio y/o de magnesio hasta un valor de pH de 3-10, obteniéndose una solución, que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio y

h) se somete la solución que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio a un secado y/o formulación.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque no se le añade al medio de cultivo ninguna β -alanina libre y/o sal de β -alanina.

25 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque se usa como microorganismo que forma ácido D-pantoténico una bacteria, una levadura o un hongo.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se usa como microorganismo una bacteria de la familia de las *Bacillaceae*.

30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se usa una bacteria del género *Bacillus* y preferiblemente de la especie *B. subtilis*, *B. licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*.

35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque en la etapa a) se forma un contenido en ácido D-pantoténico y/o sus sales de al menos 10 g/l del medio de cultivo, preferiblemente al menos 20 g/l, especialmente preferible al menos 40 g/l y lo más especialmente preferible al menos 60 g/l del medio de cultivo.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque en la etapa c) se ajusta el pH de la solución a un valor de 5-10.

40 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque en la etapa c) se ajusta el pH de la solución a un valor de 5-9, preferiblemente de 6-9 y especialmente preferible de 6-8.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque en la etapa b) se utilizan membranas de intercambio iónico monopolares y/o bipolares.

45 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque en la etapa b) se utilizan membranas de intercambio iónico monopolares.

50 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque en la etapa b) se utilizan membranas de intercambio iónico monoselectivas.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque se ajusta el valor de pH de la solución de fermentación que contiene ácido D-pantoténico antes del tratamiento en la etapa b) al valor de pH isoeléctrico del ácido D-pantoténico.

55 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque en la etapa b) se ajustan las densidades de corriente a 1-100 mA/cm², preferiblemente a 10-80 mA/cm² y especialmente preferible a de 20-40 mA/cm² para membranas de intercambio iónico monopolares.

60 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque en la etapa b) se ajustan las densidades de corriente a 1-150 mA/cm², preferiblemente a 30-100 mA/cm² y especialmente preferible a de 70-90 mA/cm² para membranas de intercambio iónico bipolares.

65 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque en la etapa b) se reduce el contenido en cationes monovalentes, preferiblemente iones amonio, potasio y/o sodio, a una concentración de \leq 1 g/kg de solución.

ES 2 274 967 T3

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque en la etapa c) se añade a la solución, para la neutralización hidróxido de calcio, carbonato de calcio, óxido de calcio, hidróxido de magnesio y/o carbonato de magnesio básico en forma de un sólido y/o como una suspensión acuosa.

5 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** porque en la etapa c) se le añade a la disolución una suspensión acuosa que contiene el 2-55% en peso, preferiblemente el 10-50% en peso y especialmente preferible el 20-40% en peso en hidróxido de calcio.

10 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** porque en la etapa c) se le añade a la disolución una suspensión acuosa que contiene el 2-65% en peso, preferiblemente el 10-50% en peso y especialmente preferible el 20-40% en peso en carbonato de calcio.

15 19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado** porque en la etapa c) se le añade a la disolución una suspensión acuosa que contiene el 2-60% en peso, preferiblemente el 10-50% en peso y especialmente preferible el 20-40% en peso en hidróxido de magnesio.

20 20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque en la etapa c) se le añade a la disolución una suspensión acuosa que contiene el 2-25% en peso, preferiblemente el 10-20% en peso en carbonato de magnesio básico.

21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizado** porque en la etapa c) o d) se obtiene o se coloca previamente una suspensión que contiene pantotenato de calcio y/o de magnesio.

25

30

35

40

45

50

55

60

65