



УКРАЇНА

(19) UA (11) 77669 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
C12N 1/20  
A23K 1/16  
C12R 1/07 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СУМІШІ D-ПАНТОТЕНОВОЇ КИСЛОТИ І ЇЇ СОЛЕЙ

1

(21) 2003098597  
(22) 20.02.2002  
(24) 15.01.2007  
(86) PCT/EP02/01766, 20.02.2002  
(31) 101 08 223.1  
(32) 21.02.2001  
(33) DE  
(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.  
(72) Бальденіус Kai-Уве, DE, Бек Крістін, DE, Фішер Андреас, DE, Харц Ханс-Петер, DE, Лошайдт Маркус, DE, Леemann Мартін, DE  
(73) БАСФ АКЦІЕНГЕЗЕЛЬШАФТ, DE  
(56) EP A 0590857, 06.04.1994  
EP A 1006192, 07.06.2000  
GB A 562267, 26.06.1944  
(57) 1. Спосіб одержання суміші D-пантотенової кислоти і її солей, який передбачає  
а) використання принаймні одного мікроорганізму, що продукує D-пантотенову кислоту, в якому порушена регуляція біосинтезу пантотенової кислоти-(рап) та/або ізолейцину/валіну-(илв) та який у процесі ферментації в культуральному середовищі продукує принаймні 2 г/л солі D-пантотенової кислоти, при цьому в культуральне середовище не додають вільний β-аланін та/або солі β-аланіну,  
б) ферментаційний розчин, що містить D-пантотенат, під впливом електричного поля пропускають через одну або декілька іоноселективних мембран, в результаті чого низькомолекулярні іони видаляються з розчину, що містить D-пантотенат, причому вміст в ньому солі D-пантотенової кислоти у вигляді одновалентних катіонів знижують до концентрації, що менше або дорівнює 1 г/кг,  
с) рН розчину, що містить вільну D-пантотенову кислоту, додаванням кальцієвих та/або магнієвих основ доводять до значення 3-10, при цьому одержують розчин, що містить пантотенат кальцію та/або магнію, і  
д) розчин, що містить пантотенат кальцію та/або магнію, піддають сушінню та/або формуванню.  
2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що як мікроорганізми, що продукують D-пантотенову

2

кислоту, використовують бактерії, дріжджі або грибки.

3. Спосіб за п. 1 або 2, який відрізняється тим, що як мікроорганізм використовують бактерію з родини Bacillaceae.

4. Спосіб за одним з пп. 1-3, який відрізняється тим, що використовують бактерію з роду Bacillus, таку, що переважно належить до виду B. subtilis, B. licheniformis або B. amyloliquefaciens.

5. Спосіб за одним з пп. 1-4, який відрізняється тим, що на стадії а) вміст D-пантотенової кислоти та/або її солей у ферментативному розчині складає принаймні 10 г/л, переважно принаймні 20 г/л, особливо переважно принаймні 40 г/л і найбільш переважно принаймні 60 г/л культурального середовища.

6. Спосіб за одним з пп. 1-5, який відрізняється тим, що на стадії с) рН розчину доводять до значення 5-10.

7. Спосіб за одним з пп. 1-6, який відрізняється тим, що на стадії с) рН розчину доводять до значення 5-9, переважно 6-9 і особливо переважно 6-8.

8. Спосіб за одним з пп. 1-7, який відрізняється тим, що на стадії б) використовують монополярні та/або біполярні іонообмінні мембрани.

9. Спосіб за одним з пп. 1-8, який відрізняється тим, що на стадії б) використовують монополярні іонообмінні мембрани.

10. Спосіб за одним з пп. 1-9, який відрізняється тим, що на стадії б) використовують моноселективні іонообмінні мембрани.

11. Спосіб за одним з пп. 1-10, який відрізняється тим, що значення рН ферментаційного розчину, що містить D-пантотенову кислоту, перед обробкою на стадії б) доводять до ізоелектричного значення рН D-пантотенової кислоти.

12. Спосіб за одним з пп. 1-11, який відрізняється тим, що на стадії б) густина струму через монополярні іонообмінні мембрани складає 1-100 мА/см<sup>2</sup>, переважно 10-80 мА/см<sup>2</sup> і особливо переважно 20-40 мА/см<sup>2</sup>.

13. Спосіб за одним з пп. 1-12, який відрізняється тим, що на стадії б) густина струму через біполярні іонообмінні мембрани складає 1-150 мА/см<sup>2</sup>,

(13) C2

(11) 77669

(19) UA

переважно 30-100 мА/см<sup>2</sup> і особливо переважно 70-90 мА/см<sup>2</sup>.

14. Спосіб за одним з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що на стадії b) вміст у розчині іонів амонію, калію та/або натрію знижують до концентрації, що менше або дорівнює 1 г/кг.

15. Спосіб за одним з пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що на стадії c) для нейтралізації в розчин додають гідроксид кальцію, карбонат кальцію, оксид кальцію, гідроксид магнію та/або основний карбонат магнію у вигляді твердої речовини та/або у вигляді водної суспензії.

16. Спосіб за одним з пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що в розчин на стадії c) додають водну суспензію, що містить 2-55 мас. %, переважно 10-50 мас. % і особливо переважно 20-40 мас. % гідроксиду кальцію.

17. Спосіб за одним з пп. 1-16, який **відрізняється** тим, що в розчин на стадії c) додають водну суспензію, що містить 2-65 мас. %, переважно 10-50 мас. % і особливо переважно 20-40 мас. % карбонату кальцію.

18. Спосіб за одним з пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що в розчин на стадії c) додають водну

суспензію, що містить 2-60 мас. %, переважно 10-50 мас. % і особливо переважно 20-40 мас. % гідроксиду магнію.

19. Спосіб за одним з пп. 1-18, який **відрізняється** тим, що в розчин на стадії c) додають водну суспензію, що містить 2-25 мас. %, переважно 10-20 мас. % основного карбонату магнію.

20. Спосіб за одним з пп. 1-19, який **відрізняється** тим, що на стадії c) або d) одержують або додають суспензію, що містить пантотенат кальцію та/або магнію.

21. Спосіб за одним з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що одержують суміш, що містить солі D-пантотенової кислоти у вигляді двовалентних катіонів, переважно D-пантотенат кальцію і/або магнію.

22. Спосіб за одним з пп. 1-21, який **відрізняється** тим, що одержують суміш, що містить солі D-пантотенової кислоти в концентрації принаймні 1-100 мас. %, переважно принаймні 20-100 мас. % і особливо переважно принаймні 50 мас. %.

23. Склад, що одержується способом за одним з пп. 1-22, як добавка і/або доповнення до корму тварин.

Представлений винахід стосується удосконаленого способу одержання D-пантотенової кислоти та/або її солей та їх використання як добавок при виробництві кормів для тварин.

Як вихідний продукт при біосинтезі коферменту А в організмі рослин і тварин широко використовується D-пантотенат. На відміну від людей, що у достатній кількості одержують пантотенову кислоту з їжею, як у рослин, так і у тварин, часто спостерігається дефіцит в організмі D-пантотенату. Можливість одержання D-пантотенату представляє, таким чином, значний економічний інтерес, особливо при виробництві кормів для тварин.

Традиційним способом одержання D-пантотенату є хімічний синтез з D-пантолактону та β-аланінату кальцію [Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 6<sup>th</sup> edition. Electronic release. Kapitel "Vitamins", 1999]. Для одержання D-пантолактону необхідне дороге класичне розділення рацемату солі на діастереомери. Продуктом, одержуваним в результаті такого хімічного синтезу, є, головним чином, кальцієва сіль D-пантотенової кислоти - D-пантотенат кальцію.

У порівнянні з хімічним синтезом перевага біотехнологічного способу одержання D-пантотенату з використанням мікроорганізмів полягає в селективності (енантіомерній чистоті) одержуваної D-форми пантотенової кислоти, придатної для споживання вищими організмами. При цьому з технологічного процесу виключається дорога операція по розділенню рацемату, що є необхідною при хімічному синтезі продукту.

Відомо безліч способів ферментаційного одержання D-пантотенової кислоти з використанням мікроорганізмів, описаних, зокрема, у міжнародних заявках на патент [WO, 96/33283; WO, 97/10340], патенті [US, 6013492], німецькій заявці на патент [DE, 19846499], європейських заявках на патент [EP, 0590857; EP, 1001027; EP, 1006189; EP, 1006192; EP, 1006193].

Так, у європейських заявках на патент [EP, 1006189; EP, 1001027] описується спосіб одержання пантотенату, при якому вміст D-пантотенової кислоти у ферментаційному розчині складає не більше 1г/л. Настільки низький вміст D-пантотенової кислоти у ферментаційному розчині, що складає менше 10 мас. % по відношенню до вмісту твердої речовини, неприйнятний для промислового виробництва добавок до корму для тварин, що містять D-пантотенову кислоту. Іншим недоліком існуючих у даний час способів є те, що виділення продукту з ферментаційного середовища вимагає проведення безлічі дорогих технологічних процесів. Спосіб одержання даного продукту в промисловому масштабі поки невідомий.

У німецькій заявці на патент [DE, 10016321] описується спосіб ферментаційного одержання добавок до кормів, що містять D-пантотенову кислоту. Істотний недолік цього способу полягає в тому, що, як і у вищезгаданих способах ферментаційного одержання D-пантотенової кислоти, для промислового виробництва необхідного продукту мікроорганізмові потрібне додання у ферментаційне середовище попередника пантотенової кислоти β-аланіну.

Крім того, у патенті [US, 6013492] та міжнародній заявці на патент [WO, 96/332839]

описується виділення D-пантотенової кислоти з ферментаційного розчину шляхом відфільтровування нерозчинних компонентів (наприклад, клітинного матеріалу) з культурального середовища, адсорбції фільтрату на активованому вугіллі, наступного елювання D-пантотенової кислоти органічним розчинником, переважно метанолом, нейтралізації гідроксидом кальцію, та наступної кристалізації D-пантотенату кальцію. Істотними недоліками цього способу є втрати дорогого продукту, що мають місце при кристалізації, а також використання органічних розчинників, що важко відокремлюються від продукту і вимагають дорогої регенерації.

У європейській заявці на патент [EP, 0590857] описується спосіб ферментаційного одержання D-пантотенової кислоти, при якому культивування мікроорганізму вимагає додання у ферментаційне середовище  $\beta$ -аланіну. Ферментаційний розчин спочатку фільтрують для відокремлення клітинної маси, потім пропускають через колонку з катіонообмінною смолою, а на завершення через колонку з аніонообмінною смолою, відразу ж після цього нейтралізують гідроксидом кальцію, випарюють, змішують з активованим вугіллем, ще раз фільтрують і після додання метанолу та хлориду кальцію кристалізують. Отриманий продукт, що містить пантотенат кальцію, має у своєму складі, крім D-пантотенової кислоти у вигляді солей кальцію, також хлорид кальцію в молярному співвідношенні 1:1. Для зниження вмісту хлориду кальцію потрібно проводити електродіаліз з подальшим розпилювальним висушуванням. Недоліком цього способу є необхідність проведення безлічі дорогих технологічних процесів і використання органічних розчинників, що знижує цінність даного методу, як з економічної, так і з екологічної точки зору.

Задача даного винаходу полягає у виробництві добавок до корму для тварин, що містять D-пантотенову кислоту та/або її солі, з використанням удосконаленого способу одержання D-пантотенової кислоти та/або її солей, що позбавлений недоліків вищезгаданих способів. При цьому з економічних розумінь найбільш бажаним є спосіб, при якому додання  $\beta$ -аланіну значно знижується або взагалі не потрібне. Крім того, бажане одержання D-пантотенової кислоти у вигляді її двовалентних солей, насамперед, у вигляді солей лужноземельних металів, оскільки двовалентні солі пантотенової кислоти володіють меншою гігроскопічністю, ніж одновалентні солі, і при подальшому використанні, наприклад, як добавок при виробництві кормів для тварин, у меншому ступені піддаються аглютинації.

Ця задача найкращим чином вирішується в рамках представленого винаходу.

Об'єктом представленого винаходу є спосіб одержання D-пантотенової кислоти та/або її солей, що відрізняється тим, що:

а) використовують, принаймні, один організм, що продукує D-пантотенову кислоту, в якому порушена регуляція біосинтезу пантотенової кислоти (pan) та/або ізолейцину/валіну (ilv), та

який у процесі ферментації в культуральному середовищі продукує, принаймні, 2г/л солі D-пантотенової кислоти, причому в культуральне середовище додають 0-20г/л вільного  $\beta$ -аланіну та/або солей  $\beta$ -аланіну;

б) ферментаційний розчин, що містить D-пантотенат, під впливом електричного поля пропускають через одну або декілька іоноселективних мембран, в результаті чого низькомолекулярні іони видаляються з розчину, що містить D-пантотенат;

с) рН розчину, що містить вільну D-пантотенову кислоту, доданням кальцієвих та/або магнієвих основ доводять до значення 5-10, при цьому одержують розчин, що містить пантотенат кальцію та/або магнію, і

д) розчин, що містить пантотенат кальцію та/або магнію, піддають сушінню та/або формуванню.

В одному з варіантів заявленого в даному винаході способу на стадії с) або d) одержують або додають суспензію, що містить хлорид кальцію та/або магнію.

Ферментація на стадії а) заявленого в даному винаході способу здійснюється за відомою технологією в замкнутій культурі без підживлення, з одноразовим або багаторазовим підживленням, або в культурі з безперервним підживленням. При цьому для нейтралізації отриманої пантотенової кислоти використовують звичайну буферну систему, таку як, наприклад, фосфатний буфер з розчинами гідроксиду натрію, гідроксиду калію або аміаку.

В інших варіантах заявленого в даному винаході способу на стадії а) в результаті ферментації в культуральному середовищі одержують, принаймні, 10г/л, переважно, принаймні, 20г/л, особливо переважно, принаймні, 40г/л, найбільш переважно, принаймні, 60г/л і особливо, принаймні, 70г/л солі D-пантотенової кислоти.

У рамках даного винаходу під терміном "продувати" варто розуміти, що організм може синтезувати більші кількості D-пантотенової кислоти та/або її солей, ніж це потрібно для власного метаболізму. У кращому варіанті реалізації даного винаходу синтезована D-пантотенова кислота та/або її солі не накопичуються всередині клітин, а в ідеальному випадку повністю надходять з організму в культуральне середовище. Таке виведення може здійснюватися активно або пасивно за відомими механізмами.

У рамках даного винаходу як організми, що продукують D-пантотенову кислоту, використовують мікроорганізми. До них відповідно до винаходу відносяться грибки, дріжджі та/або бактерії. Кращим відповідно до даного винаходу є використання грибків або дріжджів, таких як, наприклад, *Saccharomyces* або *Debaromyces*, переважно *Saccharomyces cerevisiae*. Кращим відповідно до даного винаходу є використання корінебактерій або *Bacillaceae*. У рамках даного винаходу кращими є бактерії родів *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*,

*Bevibacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Acinetobacter* або *Rhizobium*. Особливо кращими є *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium breve* або *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* та інші види *Bacillus* групи 1, що характеризуються 16S РНК, або *Actinomyces*. Даний перелік служить лише для пояснення і ніяк не обмежує представленого винаходу.

Крім того, об'єктом представленого винаходу є також генетично видозмінені організми, які використовуються для одержання добавок до корму для тварин, що містять вільну D-пантотенову кислоту та/або її солі відповідно до даного винаходу. Такі генетично видозмінені організми можуть бути отримані, наприклад, шляхом хімічного мутагенезу з наступною селекцією прийнятим методом "скринінга". Об'єктом представленого винаходу також є так звані "продукційні штами", придатні для одержання продукту в рамках представленого винаходу, та генетичні зміни метаболізму, що включають D-пантотенову кислоту, у тому числі зміни, що зачіпають процес виведення D-пантотенової кислоти та/або її солей через клітинну мембрану. Цього можна досягати, наприклад, шляхом внесення змін у ключові моменти відповідних метаболічних шляхів використовованого організму.

Можливе також використання трансгенних організмів, отриманих за допомогою гомологічних та/або гетерологічних нуклеотидних послідовностей, необхідних для синтезу потрібного продукту. При цьому зміни, що обумовлюють надлишкову експресію та/або порушення регуляції одного або декількох генів окремо та/або в комбінації, можуть знаходитися в геномі та/або у векторі, що використовується.

Подібні трансгенні організми можуть містити додаткові копії та/або видозмінені гени із групи *panB*, *panC*, *panD*, *panE* та/або їх комбінації та/або навіть цілі експресійні блоки, такі, як оперон *panBCD*. Крім того, можуть зачіпатися також й інші метаболічні шляхи використовуваних організмів, наприклад, шлях біосинтезу ізолейцину-валіну, як це описано, зокрема в європейських заявках на патент [EP, 1006189; EP, 1006192; EP, 1006193; EP, 1001027]. У результаті цього досягається збільшення концентрації відповідних попередників з розгалуженим ланцюгом, необхідних для біосинтезу пантотенової кислоти. Переважно це досягається за допомогою надлишкової експресії генів, що відповідають за цей метаболічний шлях, тобто *ilvB*, *ilvN*, *ilvC* та/або *ilvD*.

Крім того, у рамках даного винаходу передбачається можливість генетичних змін, що зачіпають аспартат-а-декарбоксилазу (*panD*), наприклад, за допомогою індукування надлишкової експресії та/або порушення регуляції відповідного гена в організмі, використовуваному для виробництва D-пантотенової кислоти.

Під терміном "порушення регуляції" у рамках даного винаходу варто розуміти наступне: зміну

або модифікацію, принаймні, одного гена, що кодує один з ферментів біосинтетичного метаболічного шляху, таким чином, що активність ферменту мікроорганізму змінюється або модифікується. Бажано, щоб, принаймні, один ген, що кодує один з ферментів біосинтетичного метаболічного шляху, був змінений таким чином, щоб генний продукт утворювався більш інтенсивно або виявляв підвищену активність. Термін "метаболічний шлях з порушеною регуляцією" включає також біосинтетичний метаболічний шлях, в якому кілька генів, що кодують кілька ферментів, змінені або модифіковані таким чином, що активності декількох ферментів змінюються або модифікуються.

Можливі зміни або модифікації включають, але не обмежуються, наступні: видалення ендogenous промотору або регуляторних елементів; введення більш сильних промоторів, або декількох промоторів одночасно; видалення регуляторних послідовностей, що впливають на експресію генного продукту; зміну розташування гена усередині хромосоми; зміну послідовності ДНК поблизу гена або всередині нього, наприклад, сайтів зв'язування рибосом (RBS); збільшення кількості копій гена в геномі або введення плазмід, що містять різну кількість копій даного гена; модифікацію білків (наприклад, регуляторних білків, супресорів, енхансерів, активаторів транскрипції, тощо), що беруть участь у процесах транскрипції гена та/або трансляції з утворенням відповідного генного продукту. Сюди відносяться також будь-які інші можливості порушення регуляції експресії гена, доступні для сучасної технології, такі як, наприклад, використання антисмислових олігонуклеотидів або блокування репресорних білків.

Порушення регуляції передбачає також зміни в області кодуючого гена, що приводять, наприклад, до усунення зворотного зв'язку в системі регуляції синтезу генного продукту, до підвищення або зниження специфічної активності генного продукту.

Крім того, у рамках даного винаходу переважними є такі генноінженерні зміни ферментів, що впливають на перетворення попередників пантотенової кислоти у відповідний продукт та/або пантотенової кислоти в кофермент А. Прикладом генів, що кодують такі ферменти, є: *alsD*, *avtA*, *ilvE*, *ansB*, *coaA*, *coaX* і багато інших. Вказаний перелік служить лише для пояснення і не призначений для обмеження представленого винаходу.

Крім того, переважними є такі генноінженерні зміни, що забезпечують накопичення в клітинах кофакторів (таких, як метилентетрагідрофолат, редокс еквіваленти та інші) в оптимальній для виробництва пантотенової кислоти концентрації.

У кращому варіанті виконання β-аланін повинен бути присутнім у клітинах у більш високій концентрації, ніж у генетично незмінених організмах, що дозволило б уникнути додання його в культуральне середовище, як це потрібно, наприклад, у європейській заявці на патент [EP, 0590857, A]. Кращими є мікроорганізми з

порушеною регуляцією біосинтезу пантотенової кислоти (*pan*), та/або ізолейцину/валіну (*ilv*), та/або аспартат- $\alpha$ -декарбоксилази (*panD*). Крім того, кращим є також додаткова надлишкова експресія в мікроорганізмах кетопантоат-редуктази (*panE*).

Крім того, у рамках даного винаходу може бути кращим зниження активності або повне вимикання гена *coaA* (наприклад, у різних видах *Bacillus*), необхідного для синтезу коферменту А. Для цієї ферментативної функції *Bacillus* містить крім гена *coaA* інший ген (= *coaX*). Активність цього гена *coaX* або відповідного ферменту також може бути змінена, переважно знижена, або навіть цілком пригнічена, оскільки *coaA* сам по собі виявляє ще достатню, хоча і знижену ферментативну активність, тобто ферментативна активність *coaA* губиться не цілком. Крім надлишкової експресії різних генів кращими є також генетичні маніпуляції з промоторними ділянками цих генів, що приводять до надлишкової експресії генного продукту.

В одному з варіантів здійснення представленого винаходу використовуються бактеріальні штами, описані в заявці [PCT/US, 00/25993], наприклад, *Bacillus subtilis* PA 824, та/або їх похідні. В іншому варіанті здійснення винаходу відповідно до заявленого в даному винаході способу використовується мікроорганізм *Bacillus subtilis* PA 668, описаний у заявці [US, 60/262995]. Ці штами *Bacillus subtilis* PA 824 і PA 668 можуть бути отримані таким способом:

Зі штаму *Bacillus subtilis* 168 (штам Marburg ATCC 6051), що володіє генотипом *trpC2* (*Trp*<sup>-</sup>), шляхом трансдукції маркера *Trp*<sup>+</sup> (з *Bacillus subtilis* дикого типу W23) був отриманий штам PY79. У штам PY79 класичними генноінженерними методами, наприклад, описаними в [Harwood C.R., Cutting S.M. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. - Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd., 1990] вносилися мутації  $\Delta$ *panB* і  $\Delta$ *panE1*.

Отриманий штам трансформували геномною ДНК штаму PA221 *Bacillus subtilis* (генотип *P<sub>26</sub>panBCD, trpC2* (*Trp*<sup>-</sup>)) та геномною ДНК штаму PA303 *Bacillus subtilis* (генотип *P<sub>26</sub>panE1*). Отриманий штам PA327 мав генотип *P<sub>26</sub>panBCD, P<sub>26</sub>panE1* і був аутотрофним по триптофану (*Trp*<sup>+</sup>). При використанні штаму PA327 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY (суміш 25г/л телячого інфузійного бульйону Difco, 5г/л дріжджового екстракту Difco, 5г/л глутамату натрію, 2,7г/л сульфату амонію розчиняють у воді для одержання 740мл розчину, автоклавують, після чого додають 200мл розчину 1М фосфату калію, рН 7,0 і 60мл 50% стерильного розчину глюкози) з додаванням 5г/л  $\beta$ -аланіну і 5 г/л  $\alpha$ -кетозовалерату вдається досягти концентрації пантотенової кислоти 3,0г/л (24год.).

Одержання штаму PA221 *Bacillus subtilis* (генотип *P<sub>26</sub>panBCD, trpC2* (*Trp*<sup>-</sup>))

Класичними генноінженерними методами за допомогою послідовності оперона *panBCD* *E. coli* [Merkel et al. // FEMS Microbiol. Lett. – 1996. – 143. – P. 247-252] з плазмідної бібліотеки *Bacillus subtilis* GP275 був клонований оперон *panBCD* *Bacillus*. Для клонування використовували штам BM4062 *E.*

*coli* (*bir*<sup>ts</sup>) та інформацію, що оперон *Bacillus* розташовується поруч з геном *birA*. Оперон *panBCD* вбудовували в плазмід, що реплікується в *E. coli*. Для підвищення експресії оперона *panBCD* промотор замінювали на сильний, конститутивний промотор фага *Bacillus subtilis* SP01 (*P<sub>26</sub>*), а ділянку зв'язування рибосоми (=RBS) перед геном *panB* на штучну ділянку зв'язування. Перед касетою *P<sub>26</sub>panBCD* у плазміді вбудовували фрагмент ДНК, розташований безпосередньо вище нативного гена *panB* у геномі *Bacillus*. Цю плазмід трансформували в штам RL-1 *Bacillus subtilis* (отримана шляхом класичного мутагенезу похідна *Bacillus subtilis* 168 (штам Marburg ATCC 6051), генотип *trpC2* (*Trp*<sup>-</sup>)), і в результаті гомологічної рекомбінації нативний оперон *panBCD* замінювали опероном *p<sub>26</sub>panBCD*. Отриманий штам називався PA221 і мав генотип *P<sub>26</sub>panBCD, trpC2* (*Trp*<sup>-</sup>).

При використанні штаму PA221 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY з додаванням 5г/л  $\beta$ -аланіну і 5г/л  $\alpha$ -кетозовалерату вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 0,92г/л (24год.).

Одержання штаму PA303 *Bacillus subtilis* (генотип *P<sub>26</sub>panE1*)

За допомогою послідовності гена *panE* *E. coli* аналогічним чином клонували послідовність гена *panE* *Bacillus*. Виявилось, що в геномі *Bacillus subtilis* присутні два гомологи гена *panE* *E. coli*, які одержали назви *panE1* і *panE2*. При аналізі результатів делецій одного та іншого гена виявилось, що ген *panE1* відповідальний за виробництво 90% пантотенової кислоти, у той час як делеція гена *panE2* не справляла значного ефекту на рівень виробництва пантотенової кислоти. У цьому випадку, як і при клонуванні оперона *panBCD*, промотор був замінений на сильний конститутивний промотор *P<sub>26</sub>*, а ділянка зв'язування рибосоми перед геном *panE1* штучною ділянкою зв'язування. Фрагмент *P<sub>26</sub>panE1* клонували у вектор, що був сконструйований таким чином, щоб фрагмент *P<sub>26</sub>panE1* міг вбудовуватися у вихідний локус *panE1* у геномі *Bacillus subtilis*. Отриманий в результаті трансформації та гомологічної рекомбінації штам називався PA303 і мав генотип *P<sub>26</sub>panE1*. При використанні штаму PA303 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY з додаванням 5г/л  $\beta$ -аланіну і 5г/л  $\alpha$ -кетозовалерату вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 1,66г/л (24год.).

Подальше конструювання штаму здійснювали шляхом трансформації PA327 плазмідною, що містить оперон *P<sub>26</sub>ilvBNC* та маркерний ген спектиноміцину. Оперон *P<sub>26</sub>ilvBNC* вбудовували в локус *amyE*, що було показано методом ПЛР. Отриманий штам одержав назву PA340 (генотип *P<sub>26</sub>panBCD, P<sub>26</sub>panE1, P<sub>26</sub>ilvBNC, specR, trpC2* (*Trp*<sup>-</sup>)).

При використанні штаму PA340 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY з додаванням тільки 5г/л  $\beta$ -аланіну вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 3,6г/л (24год.), у 10мл культури в середовищі SVY з додаванням 5г/л  $\beta$ -

аланіну і 5г/л  $\alpha$ -кетозовалерату вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 4,1г/л (24год.).

Потім у штам PA340 вводили розрегульовану касету *ilvD*. Для цього штам PA340 трансформували плазмідом, що містить ген *ilvD* під контролем промотору  $P_{26}$  зі штучною ділянкою зв'язування рибосоми RBS2. При цьому ген  $P_{26ilvD}$  в результаті гомологічної рекомбінації вбудовували у вихідний локус *ilvD*. Отриманий штам PA374 мав генотип  $P_{26panBCD}$ ,  $P_{26panE1}$ ,  $P_{26ilvBNC}$ ,  $P_{26ilvD}$ , *specR* і *trpC2* ( $Trp^+$ ).

При використанні штаму PA374 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY з додаванням тільки 5г/л  $\beta$ -аланіну вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 2,99г/л (24год.).

Для одержання пантотенової кислоти за допомогою штаму PA374 без добавки  $\beta$ -аланіну у штам PA374 вносили додаткові копії гена *panD*, що кодує аспартат- $\alpha$ -декарбоксилазу. Для цього штам PA374 трансформували хромосомною ДНК штаму PA401. Шляхом селекції на тетрациклін був отриманий штам PA377. Отриманий штам PA377 мав генотип  $P_{26panBCD}$ ,  $P_{26panE1}$ ,  $P_{26ilvBNC}$ ,  $P_{26ilvD}$ , *specR*, *tetR* і *trpC2* ( $Trp^+$ ).

При використанні штаму PA377 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY без додавання попередника вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 1,31г/л (24год.).

Одержання штаму PA401 *Bacillus subtilis* (генотип  $P_{26panD}$ )

Ген *panD* *Bacillus subtilis* клонували з оперона *panBCD* у вектор, що містить маркерний ген стійкості до тетрацикліну. Перед геном *panD* клонували промотор  $P_{26}$  та один з вищеописаних штучних сайтів зв'язування рибосоми. Шляхом обробки рестриктазами був отриманий фрагмент, що містить маркерний ген стійкості до тетрацикліну і ген  $P_{26panD}$ . Виділений фрагмент регулювали та трансформували у вищеописаний штам PA221. При цьому фрагмент вбудовували в геном штаму PA211. Отриманий штам PA401 мав генотип  $P_{26panBCD}$ ,  $P_{26panD}$ , *tetR* і *trpC2* ( $Trp^+$ ).

При використанні штаму PA401 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY з додаванням 5г/л  $\alpha$ -кетозовалерату вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 0,3г/л (24год.). У 10мл культури в середовищі SVY з додаванням 5г/л D-пантотенової кислоти і 10г/л L-аспартату вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 2,2г/л (24год.).

Зі штаму PA377 шляхом трансформації хромосомної ДНК штаму PY79 був отриманий прототрофний по триптофану штам. Цей штам PA824 мав генотип  $P_{26panBCD}$ ,  $P_{26panE1}$ ,  $P_{26ilvBNC}$ ,  $P_{26ilvD}$ , *specR*, *tetR* і  $Trp^+$ .

При використанні штаму PA824 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY без додавання попередника вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 4,9г/л (48год.) (у порівнянні з PA377: 3,6г/л за 48год.).

Одержання штаму PA668

Ген *panB* *Bacillus subtilis* клонували з оперона *panBCD* дикого типу та вставляли у вектор, що містить, крім гена стійкості до хлорамфеніколу, також послідовності локусу *vrp* *Bacillus subtilis*.

Сильний конститутивний промотор  $P_{26}$  вбудовували перед 5' кінцем гена *panB*. Шляхом обробки рестриктазами був отриманий фрагмент, що містить ген  $P_{26panB}$ , маркерний ген стійкості до хлорамфеніколу, а також послідовності *vrp* *Bacillus subtilis*..

Виділений фрагмент повторно лігували та трансформували в штам PA824. Отриманий штам одержав назву PA668. Отриманий штам PA668 мав генотип  $P_{26panBCD}$ ,  $P_{26panE1}$ ,  $P_{26ilvBNC}$ ,  $P_{26ilvD}$ ,  $P_{26panB}$ , *specR*, *tetR*, *CmR* та  $Trp^+$ .

Були виділені дві колонії штаму PA668, що одержали назви PA668-2A і PA668-24.

При використанні штаму PA668-2A *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY без додавання попередника протягом 48год. вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 1,5г/л. У 10мл культури з додаванням 10г/л L-аспартату вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 5г/л.

При використанні штаму PA668-24 *Bacillus subtilis* у 10мл культури в середовищі SVY без додавання попередника протягом 48год. вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 1,8г/л. У 10мл культури з додаванням 10г/л L-аспартату вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти 4,9г/л.

Детально конструювання цього штаму описане в заявці [US, 60/262995] та у заявці [PCT/US, 00/25993].

При використанні вищеописаного штаму PA377 у процесі лімітованої по глюкозі ферментації в середовищі SVY, що має склад, г/л:

телячий інфузійний бульйон Difco	25;
дріжджовий екстракт Difco	5;
триптофан	5;
глутамат натрію	5;
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20;
CaCl <sub>2</sub>	0,1;
MgSO <sub>4</sub>	1,0;
цитрату натрію	1,0;
FeSO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O	0,01

і 1мл/л розчину розчинених у воді (для одержання 1л) солей мікроелементів наступного складу, г:

Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O	0,15;
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,50;
CoCl <sub>2</sub> ·xH <sub>2</sub> O	0,70;
CuSO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O	0,25;
MnCl <sub>2</sub> ·xH <sub>2</sub> O	1,60;
ZnSO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O	0,30;

в об'ємі 10л при безперервному додаванні розчину глюкози протягом 36год. (48год.) вдалося досягти концентрації пантотенової кислоти у ферментаційному розчині 18-19г/л (22-25г/л).

При використанні штаму PA824, прототрофної по триптофану похідної штаму PA377, у процесі лімітованої по глюкозі ферментації в середовищі на дріжджовому екстракті, г/л:

дріжджовий екстракт Difco	10;
глутамат натрію	5;
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10;

$K_2HPO_4$  20;  
 $CaCl_2$  0,1;  
 $MgSO_4$  1,0;  
 цитрату натрію 1,0;  
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01,  
 і 1мл/л вищеописаного сольового розчину  
 мікроелементів) в об'ємі 10л при безперервному  
 додаванні розчину глюкози протягом 36год., 48год.  
 та 72год. вдалося досягти наступних значень  
 концентрації пантотенової кислоти у  
 ферментаційному розчині 20г/л, 28г/л і 36г/л.

Шляхом подальшої оптимізації середовища при використанні штаму PA824 у процесі лімітованої по глюкозі ферментації в середовищі, що складалося з, г/л:

дріжджовий екстракт Difco 10;  
 нітрозоаміну А (Quest International  
 GmbH, Erfstadt) 10;  
 глутамат натрію 10;  
 $(NH_4)_2SO_4$  4;  
 $KH_2PO_4$  10;  
 $K_2HPO_4$  20;  
 $CaCl_2$  0,1;  
 $MgSO_4$  1,0;  
 цитрату натрію 1,0;  
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01,  
 і 1мл/л вищеописаного сольового розчину  
 мікроелементів) в об'ємі 10л при безперервному  
 додаванні розчину глюкози протягом 36год.  
 (48год.) вдалося досягти наступних значень  
 концентрації пантотенової кислоти у  
 ферментаційному розчині 37г/л (48г/л).

Додаткового підвищення концентрації пантотенової кислоти у ферментаційному розчині можливо досягти шляхом подальшої оптимізації середовища, збільшення тривалості ферментації, удосконалення технологічних процедур та використання штаму, а також за допомогою комбінації запропонованих заходів. Крім того, зазначені вище концентрації пантотенової кислоти можуть бути досягнуті за допомогою ферментації з використанням штамів, що є похідними від вищеописаного штаму PA824. Ці похідні можуть бути отримані шляхом класичних методів розробки штамів, а також за допомогою генної інженерії маніпуляцій. Шляхом удосконалення середовища, штамів і технології ферментації можна досягти підвищення концентрації пантотенової кислоти у ферментаційному розчині до 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 і більше 90г/л.

Істотною перевагою заявленого в даному винаході способу є те, що ферментація протікає в культуральному середовищі, що, крім джерел вуглецю та азоту, як вихідні сполуки не містить інших попередників кінцевого продукту. Таким чином, біосинтез D-пантотенової кислоти є незалежним від додавання інших попередників. Під такими попередниками в рамках даного винаходу варто розуміти такі речовини, як  $\beta$ -аланін, та/або L-аспартат, та/або L-валін, та/або  $\alpha$ -кетоглутарат, та/або їх комбінації.

У кращому варіанті заявленого в даному винаході способу ферментація здійснюється організмом, що продукує D-пантотенову кислоту, в культуральному середовищі, що містить одне

джерело вуглецю та одне джерело азоту, але без додавання вільного  $\beta$ -аланіну та/або солей  $\beta$ -аланіну перед або в процесі ферментації. Тобто, для одержання D-пантотенової кислоти в концентрації, принаймні, 10г/л культурального середовища, переважно, принаймні, 20г/л, особливо переважно, принаймні, 40г/л, найбільш переважно, принаймні, 60г/л і особливо, принаймні, 70г/л, відповідно до винаходу не потрібне додавання вільного  $\beta$ -аланіну та/або солей  $\beta$ -аланіну. Незалежність від додавання попередника представляє собою важливу з економічної точки зору перевагу заявленого в даному винаході способу в порівнянні з відомими способами, оскільки більшість попередників є дуже дорогими.

Проте у рамках даного винаходу не виключається додавання  $\beta$ -аланіну та/або солей  $\beta$ -аланіну в культуральне середовище, у який спосіб вихід D-пантотенової кислоти може бути додатково підвищений шляхом додавання  $\beta$ -аланіну та/або солей  $\beta$ -аланіну. При цьому виходять з того, що, якщо всі необхідні попередники пантотенової кислоти наявні в достатній кількості і додаткове збільшення виробництва пантотенової кислоти обмежується лише активністю гена *panD*, то вихід D-пантотенової кислоти можна підвищити, наприклад, ще на 50%, шляхом додавання вільного  $\beta$ -аланіну та/або солей  $\beta$ -аланіну. В одному з кращих варіантів представленого винаходу для додаткового підвищення виходу D-пантотенової кислоти більше, ніж на 50%, у культуральне середовище можна додавати до 20г/л вільного  $\beta$ -аланіну та/або солей  $\beta$ -аланіну. Кращим є додавання в культуральне середовище приблизно 15г/л вільного  $\beta$ -аланіну та/або солей  $\beta$ -аланіну.

Прикладами прийнятних у рамках даного винаходу джерел вуглецю, що додаються в культуральне ферментаційне середовище з вищезгаданими мікроорганізмами, є цукри, такі, як гідролізати крохмалю (моно-, ди- та олігосахариди), переважно глюкоза або сахароза, а також бурякова або очеретяна цукрова патока, білки, білкові гідролізати, соєве борошно, кукурудзяний сік, жири, вільні жирні кислоти, клітини, отримані в результаті ферментаційних процесів, або їх гідролізати, а також дріжджовий екстракт. Вказаний перелік не може розглядатися як обмеження представленого винаходу.

Крім того, кращий спосіб, заявлений у даному винаході, характеризується тим, що загальний вміст цукру в розчині до кінця ферментаційного процесу повинен бути, по можливості, зведений до мінімуму, оскільки інакше він в результаті склеювання утруднює наступне сушіння та/або формування ферментаційного розчину. Цього відповідно до даного винаходу можна досягти, продовжуючи ферментацію ще якийсь час після того, як джерело вуглецю буде вичерпано (при культивуванні в замкнутій культурі без підживлення), або після того, як припиниться подача джерела вуглецю (при протіканні процесу в культурі з однократним або багаторазовим підживленням), та/або відрегулювавши процес таким чином, щоб концентрація джерела вуглецю

в кінці процесу практично дорівнювала нулю (у культурі з однократним або багаторазовим підживленням або в культурі з безперервним підживленням).

Цього відповідно до винаходу досягають за рахунок того, що після припинення подачі джерела вуглецю (наприклад, цукрового розчину) ферментація продовжується доти, поки концентрація розчиненого кисню ( $pO_2$ ) не досягне, принаймні, 80%, переважно 90% і особливо переважно 95% від значення насичення у ферментаційному розчині.

Прикладами прийнятних відповідно до винаходу джерел азоту є аміак, сульфат амонію, сечовина, білки, білкові гідролізати або дріжджовий екстракт. Вказаний перелік не може розглядатися як обмеження представленого винаходу.

Крім того, ферментаційне середовище містить мінеральні солі та/або мікроелементи, а також амінокислоти та вітаміни. Точний склад прийнятних ферментаційних середовищ добре відомі фахівцям уданій області.

Після інокуляції ферментаційного середовища прийнятним мікроорганізмом, що продукує D-пантотенову кислоту (з відомою фахівцям концентрацією клітин), здійснюють культивування даного мікроорганізму при доданні, у разі необхідності, протистігуючої присадки. При необхідності, відрегулювати значення pH середовища можна за допомогою різних неорганічних або органічних лугів або кислот, таких, як наприклад, гідроксид натрію, гідроксид калію, аміак, фосфорна кислота, сірчана кислота, соляна кислота, мурашина кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота і т.д.

У залежності від використовуваної при ферментації буферної системи, що, як описано вище, може містити в собі такі компоненти як, гідроксид натрію, гідроксид калію, аміак, фосфорна кислота, сірчана кислота, соляна кислота, мурашина кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота і т.д., D-пантотенова кислота, що утворюється у ферментаційному розчині, може знаходитися у вигляді відповідної солі (солей). Оскільки при цьому наявність одновалентних катіонів солей D-пантотенової кислоти є небажаною, відповідно до винаходу ферментаційний розчин піддають обробці методом електричного розділення на мембрані.

Таким чином, представлений винахід включає всі доступні методи електричного розділення на мембрані, такі як мембранний електроліз або електродіаліз. Вибір прийнятного методу залишається у компетенції фахівця в даній області. У рамках даного винаходу кращим є використання електродіалізу. При цьому використовуються як електродіаліз із застосуванням винятково монополярних мембран, так і електродіаліз із застосуванням моно- та/або біполярних мембран. Найбільш переважними є методи електродіалізу при використанні винятково монополярних мембран, особливо електродіаліз з використанням селективних для одновалентних

іонів монополярних мембран, так званих моноселективних мембран.

У принципі, для реалізації заявленого в даному винаході способу можуть використовуватися будь-як мембрани, що звичайно застосовуються при електродіалізі. Для проведення електродіалізу в рамках даного винаходу переважно використовуються наявні в продажі іонообмінні мембрани.

Як аніонообмінні мембрани можуть використовуватися, наприклад, мембрани Neosepta AMI, AM2, AM3, AMX, AMH, AFN, виробництва Tokuyama Corp. і AMV виробництва Asahi Glass.

Як катіонообмінні мембрани можуть використовуватися, наприклад, мембрани Neosepta CM1, CM2, CMX, CMH, CMB, Asahi Glass CMV, а також Nafion 435 або 350 виробництва Du Pont de Nemours.

Як моноселективна катіонообмінна мембрана може використовуватися, наприклад, мембрана Neosepta CMS.

Як моноселективні аніонообмінних мембран можуть використовуватися, наприклад, мембрани Neosepta ACS виробництва Tokuyama Corp. або Selmion ASV виробництва Asahi Glass in Betracht.

Як матеріали для електрода можуть використовуватися нержавіюча сталь, нікель, благородні метали, наприклад, платина, та інші матеріали, відомі фахівцям уданій галузі.

При використанні монополярного електродіалізу в рамках даного винаходу як аніони, так і катіони з розчину, що містить D-пантотенат, можуть під дією електричного поля мігрувати через аніоно- або катіонообмінні мембрани в інший розчин (розчин концентрату, KONZ), і в результаті цього вони видаляються з розчину, що містить пантотенову кислоту (розчин ділюату, DIL). Відповідно до винаходу з розчину, що містить пантотенову кислоту, переважно видаляються низькомолекулярні іони. Під низькомолекулярними іонами в рамках даного винаходу варто розуміти іони, що входять до складу культурального середовища та/або буферної системи, але є небажаними в кінцевому продукті. До них відносяться, зокрема, наступні іони: іони амонію, калію, натрію, заліза, хлорид-іони, фосфат-іони або сульфат-іони.

В іншому варіанті реалізації представленого винаходу здійснюється іонний обмін одновалентних катіонів, таких як іони натрію або амонію, на багатовалентні катіони, такі як іони кальцію. При цьому використовуються катіонообмінні мембрани, що є селективними для одновалентних іонів. Так, наприклад, у першу камеру I вносять розчин хлориду кальцію, а в другу камеру II, відокремлену від камери I катіонообмінною мембраною, розчин D-пантотенової кислоти, що містить одновалентні катіони. Потім у третю камеру III через встановлену між камерою II та камерою III селективну для одновалентних іонів катіонообмінну мембрану, переносяться переважно одновалентні катіони. Одночасно з камери I у камеру III через встановлену між



камерою I та камерою III аніонообмінну мембрану переносяться аніони, такі як хлорид-іони. Іони кальцію переносяться з камери I у камеру II через катіонообмінну мембрану. У такий спосіб безпосередньо утворюється D-пантотенат кальцію. При наявності солей слабких кислот, таких як, наприклад, пантотенова кислота, за допомогою подібної системи можна також одержувати вільну D-пантотенову кислоту, якщо замість розчину хлориду кальцію в камеру I внести водний розчин соляної кислоти.

При реалізації представленого винаходу можуть також використовуватися солі кальцію та/або магнію у вигляді неорганічних або органічних аніонів. Переважно в рамках даного винаходу використовуються хлорид, нітрат, гідроксид, форміат, ацетат, пропіонат, гліцинат та/або лактат кальцію та/або магнію.

В одному з варіантів здійснення представленого винаходу в процесі проведення біполярного електродіалізу катіони переважно переносяться (при одночасному утворенні протонів у результаті дисоціації води в біполярній мембрані) з розчину, що містить D-пантотенат, через катіонообмінну мембрану в другий розчин і в такий спосіб відокремлюються від розчину, що містить пантотенову кислоту. В другому розчині при взаємодії з гідроксид-іонами, що утворюються в результаті дисоціації води в біполярній мембрані, перенесені катіони утворюють відповідні основи.

В іншому варіанті здійснення представленого винаходу в процесі проведення біполярного електродіалізу аніони переважно переносяться (при одночасному утворенні гідроксид-іонів у результаті дисоціації води в біполярній мембрані) з розчину, що містить D-пантотенат, через аніонообмінну мембрану в другий розчин, і в такий спосіб відокремлюються від розчину, що містить пантотенову кислоту. В другому розчині при взаємодії з протонами, що утворюються в результаті дисоціації води в біполярній мембрані, перенесені аніони утворюють відповідні кислоти.

Даний винахід передбачає також варіант здійснення, при якому в процесі проведення біполярного електродіалізу, з однієї сторони, аніони (при одночасному утворенні гідроксид-іонів у результаті дисоціації води в біполярній мембрані) переносяться з розчину, що містить D-пантотенат, через аніонообмінну мембрану в другий розчин, і в такий спосіб вони відокремлюються від розчину, що містить пантотенову кислоту, а з іншої сторони, катіони (при одночасному утворенні протонів у результаті дисоціації води в біполярній мембрані) переносяться з розчину, що містить D-пантотенат, через катіонообмінну мембрану в третій розчин, і в такий спосіб вони відокремлюються від розчину, що містить пантотенову кислоту. В другому розчині при взаємодії з протонами, що утворилися в результаті дисоціації води в біполярній мембрані, перенесені аніони утворюють відповідні кислоти, а в третьому розчині при взаємодії з гідроксид-іонами, що утворюються в результаті

дисоціації води в біполярній мембрані, перенесені катіони утворюють відповідні основи.

У рамках даного винаходу при реалізації представленого способу кращим є також, доведення, за допомогою кислот або основ, значення pH розчину, що містить D-пантотенат, до ізоелектричного значення pH D-пантотенової кислоти. Завдяки цьому можна ще більше підвищити вихід вільної D-пантотенової кислоти і, відповідно, знизити втрати.

Використання монополярного електродіалізу є особливо кращим, оскільки в порівнянні з біполярним електродіалізом він набагато дешевший.

Біполярний електродіаліз використовується переважно тоді, коли додавання кислот або основ для доведення значення pH не допускається або коли передбачається наступне використання кислот, що утворюються, або основ.

Усі варіанти електродіалізу, що використовуються в даному винаході, володіють тією перевагою, що вони не приводять до появи стічних вод, що утворюються при регенерації іонообмінних смол.

Використання заявленого в даному винаході методу електричного розділення дозволяє переважно видаляти небажані низькомолекулярні іони (сторонні іони), такі як іони амонію, калію, натрію, заліза, хлорид-іони, фосфат-іони або сульфат-іони, з розчину, що містить D-пантотенат. В результаті утворюється переважно вільна D-пантотенова кислота або потрібні солі, такі як D-пантотенат кальцію та/або магнію. Відповідно до даного винаходу вміст у розчині одновалентних катіонів, переважно іонів амонію, калію та/або натрію, доводиться до концентрації, що є меншою або рівною 1г/кг.

Також можна істотно знизити вміст небажаних аніонів, таких, наприклад, як хлорид-іони, фосфат-іони або сульфат-іони, шляхом використання відповідної іонообмінної мембрани, переважно, аніонообмінної мембрани.

Отриманий у такий спосіб розчин, що містить вільну D-пантотенову кислоту відповідно до винаходу, шляхом додавання кальцієвих і/або магнієвих основ доводять до значення pH від 3 до 10. Кращими є значення pH від 5 до 10. Кращим є доведення pH розчину до значень 5-9, особливо переважно до значень 6-9 і особливо до значень 6-8. У такий спосіб одержують розчин, що містить пантотенат кальцію і/або магнію. Переважно для нейтралізації в розчин додають гідроксид кальцію, карбонат кальцію, оксид кальцію, гідроксид магнію і/або основний карбонат магнію у вигляді твердої речовини і/або у вигляді водної суспензії.

При цьому кращою відповідно до винаходу є нейтралізація розчину, що містить вільну D-пантотенову кислоту, за допомогою кальцієвих та/або магнієвих основ у вигляді водної суспензії. При використанні водної суспензії нейтралізація протікає без великих коливань значення pH та швидше, ніж при застосуванні відповідних компонентів у вигляді твердої речовини.

Заявлений у даному винаході спосіб характеризується тим, що в розчин на стадії с)

додають водну суспензію, що містить 2-55мас.%, переважно 10-50мас.%. і особливо переважно 20-40мас.% гідроксиду кальцію.

Крім того, даний винахід включає спосіб, при якому в розчин на стадії с) додають водну суспензію, що містить 2-65мас.%, переважно 10-50мас.% і особливо переважно 20-40мас.% карбонату кальцію. В іншому варіанті здійснення представленого винаходу в розчин на стадії с) додають водну суспензію, що містить 2-60мас.%, переважно 10-50мас.% і особливо переважно 20-40мас.% гідроксиду магнію. Даний винахід включає також спосіб, при якому в розчин на стадії с) додають водну суспензію, що містить 2-25мас.%, переважно 10-20мас.% основного карбонату магнію.

Сушіння та/або формування розчину або суспензії, що містять пантотенат кальцію та/або магнію, здійснюють відомими методами, наприклад, такими, як розпилювальне сушіння, розпилювальна грануляція, сушіння у вихровому шарі, грануляція у вихровому шарі, сушіння в барабанній сушарці або термічне сушіння в обертовій сушарці [Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 6<sup>th</sup> edition. Electronic release. Kapitel "Drying of Solid Materials", - 1999]. Температура газу на вході при конвекційному сушінні складає від 100 до 280°C, переважно від 120 до 210°C. Температура газу на виході складає від 50 до 180°C, переважно від 60 до 150°C. Для забезпечення необхідного розподілу за розміром частинок, що визначає сполучні властивості продукту, дрібні частинки можуть уловлюватися та повертатися назад. Крім того, великі грудки можуть бути подрібнені в порошок, а потім їх також повертають назад.

Перевагою представленого винаходу є скорочення при використанні представленого вище способу дорогих технологічних процесів, особливо відмова від використання органічних розчинників, при одночасному одержанні потрібного продукту, що володіє високою біологічною цінністю. Крім того, при використанні заявленого в даному винаході способу можна значно знизити кількість стічних вод, що утворюються. Це дає додаткову економію на дорогих установках по переробці та утилізації відходів. Таким чином, спосіб, заявлений у даному винаході, володіє такою перевагою, що він є простішим, надійнішим, більш швидким, значно дешевшим і, відповідно, більш економічним, ніж традиційний спосіб.

Це, проте, не виключає деяких варіацій заявленого в даному винаході способу. Зазначені на початку технологічні стадії заявленого в даному винаході способу з а) до d) можуть бути доповнені одним або декількома додатковими стадіями, що самі по собі відомі фахівцям у даній області. При цьому даний винахід містить у собі всі можливі комбінації цих додаткових (факультативних) технологічних стадій з (істотними) технологічними стадіями з а) до d).

Так, розчини або суспензії, отримані на стадіях а)-с), можуть, наприклад, піддаватися знезаражуванню шляхом нагрівання (стерилізації)

або іншими методами, такими, наприклад, як пастеризація або стерильна фільтрація.

В інших варіантах заявленого в даному винаході способу перед сушінням та/або формуванням розчину або суспензії можливе додаткове проведення однієї або декількох процедур, включаючи лізис та/або пригнічення життєдіяльності клітин, та/або відокремлення клітинної маси від ферментаційного розчину, та/або додаткове внесення наповнювачів, та/або концентрування ферментаційного розчину, переважно шляхом дегідратації.

Таким чином, об'єктом представленого винаходу є також спосіб, при якому лізис та/або пригнічення життєдіяльності клітин проводять ще в ферментаційному розчині або відразу ж після відокремлення клітинної маси від ферментаційного розчину. Це можна здійснювати, зокрема, шляхом термічної обробки, переважно при температурі 80-200°C та/або кислотної обробки, переважно сірчаною або соляною кислотою, та/або ферментативним способом, переважно за допомогою лізоциму.

В іншому варіанті здійснення представленого винаходу клітини ферментованих мікроорганізмів можуть бути шляхом фільтрації, сепарації (наприклад, центрифугування) та/або декантації вилучені з розчину або суспензії, що отримані на стадії стадіях а), b) або с) заявленого в даному винаході способу. Можливо також пропускання розчину одержаного на стадіях а), b) або с), шляхом накладання електричного поля, безпосередньо через одну або декілька іоноселективних мембран без відокремлення мікроорганізмів, що містяться в розчині.

Отриманий в результаті мембранного електролізу або електродіалізу розчин можна відразу ж після нейтралізації піддавати випарюванню для підвищення його концентрації у відповідному випарнику, наприклад, тонкоплівковому випарнику або випарнику обертового типу. Такі випарники виробляються, зокрема, фірмами GIG (4800 Attnang Пухайм, Австрія), GEA Canzler (52303 Дюрен, Німеччина), Diessel (31103 Хільдесхайм, Німеччина) та Pitton (35274 Кірхайн, Німеччина).

Для поліпшення барвних властивостей кінцевого продукту можна використовувати додаткову стадію фільтрації, при якій в отримані за допомогою зазначеного способу розчин або суспензію додають деяку кількість активованого вугілля, після цього суспензію, що містить активоване вугілля, фільтрують. Отримані в процесі ферментації розчини можуть також пропускати через тонкий шар активованого вугілля. Необхідні для цього кількості активованого вугілля, що додається, складають менше 1 мас. % ферментаційного розчину і встановлюються на розсуд відповідного фахівця.

Цей процес можна полегшити, якщо перед фільтрацією у відповідний розчин додати звичайний засіб для коагуляції (наприклад, Sedipur CF 902 або Sedipur CL 930 виробництва фірми BASF AG, Ludwigshafen).

В одному з кращих варіантів здійснення представленого винаходу ферментаційний розчин стерилізують шляхом нагрівання, а потім шляхом центрифугування, фільтрації або декантації відокремлюють від клітинної маси. Після додання звичайного засобу для коагуляції з розрахунку 50-1000мг/кг, переважно 100-200мг/кг ферментаційний розчин фільтрують через тонкий шар активованого вугілля та піску для одержання вільного від клітинної маси розчину з високим вмістом D-пантотенової кислоти. На завершення отриманий у такий спосіб розчин під впливом електричного поля пропускають через одну або декілька іоноселективних мембран.

Подальше сушіння розчину або суспензії, що містять пантотенат кальцію та/або магнію, можна здійснювати, наприклад, шляхом розпилювального сушіння. Таке сушіння може протікати в прямоковатому, протитоківому або змішаному процесі. Для розпилення можуть використовуватися усі відомі розпилювачі, зокрема, відцентрові розпилювачі, розпилювачі з одноконцентними або двоконцентними насадками. Кращий температурний діапазон сушіння складає 150-250°C на вході в барабан і 70-130°C на виході з барабана. Сушіння також можна проводити при більш високих або більш низьких температурах. Для максимального видалення залишкової вологи можна додатково проводити сушіння у вихровому шарі.

Розпилювальне сушіння також можна проводити в сушарках типу FSD (Fluidized Spray Dryer) або SBD (Spray Bed Dryer), вироблених фірмами Niro (Копенгаген, Данія) і APV-Anhydro (Копенгаген, Данія), в яких реалізується комбінація розпилювального сушіння та сушіння у вихровому шарі.

При розпилювальному сушінні в сушарку можна додавати допоміжний засіб. Це дозволяє зменшити покриття стінок сушарки та поліпшити характер плину дрібнозернистого порошку. Як допоміжний засіб можуть використовуватися, зокрема, силікати, стеарати, фосфати та кукурудзяний крохмаль.

У принципі сушіння також може здійснюватися шляхом розпилення у вихровому шарі, при цьому сушіння можна проводити як у безперервному, так і в переривчастому режимі. Подача розчину або суспензії може здійснюватися зверху (Topspray), знизу (Bottomspray) або збоку (Sidespray).

Об'єктом представленого винаходу є, крім того, склад, використовуваний як добавки та/або доповнення до корму тварин, при виробництві якого:

а) використовують, принаймні, один організм, що продукує D-пантотенову кислоту, в якому порушена регуляція біосинтезу пантотенової кислоти-(pan) та/або ізолейцину/валіну-(ily), та який в процесі ферментації в культуральному середовищі виробляє, принаймні, 2г/л солі D-пантотенової кислоти, причому в культуральне середовище додають 0-20г/л, переважно 0г/л, вільного β-аланіну та/або солей β-аланіну;

б) ферментаційний розчин, що містить D-пантотенат, під впливом електричного поля

пропускають через одну або декілька іоноселективних мембран, в результаті чого низькомолекулярні іони видаляються з розчину, що містить D-пантотенат;

с) рН розчину, що містить вільну D-пантотенову кислоту, доданням кальцієвих та/або магнієвих основ доводять до значення 3-10, при цьому одержують розчин, що містить пантотенат кальцію та/або магнію, і

д) розчин, що містить пантотенат кальцію та/або магнію, піддають сушінню та/або формуванню.

В одному з варіантів представленого винаходу склад характеризується тим, що на стадії с) або д) одержують або додають суспензію, що містить пантотенат кальцію і/або магнію.

Крім того, заявлений у даному винаході склад характеризується тим, що він містить солі D-пантотенової кислоти в концентрації, принаймні, 1-100мас.%, переважно, принаймні, 20-100мас.% і особливо переважно, принаймні, 50мас.%. Об'єктом представленого винаходу є склад, що містить солі D-пантотенової кислоти у вигляді двовалентних катіонів, переважно D-пантотенат кальцію та/або магнію. У рамках даного винаходу кращим є склад, що характеризується тим, що вміст в ньому солей D-пантотенової кислоти у вигляді одновалентних катіонів дорівнює або менше 1г/кг.

Відповідно до заявленого в даному винаході способу може бути отриманий D-пантотенат кальцію та/або магнію, що задовольняє вимогам, які пред'являються до добавок кормів для тварин. Ці вимоги передбачають, зокрема, порівняно високий вміст D-пантотенату та гарну переносимість відповідними тваринами, а також біологічну цінність у змісті "вітамінної дії" заявленого в даному винаході продукту.

Далі даний винахід більш докладно ілюструється на прикладах, що наводяться нижче, та які ніяким чином не можна розглядати як обмеження представленого винаходу:

Приклад 1:

У ферментатор об'ємом 14л, що оснащений мішалкою та аератором, заливають водне ферментаційне середовище наступного складу:

дріжджовий екстракт, г/л	10;
глутамат натрію, г/л	5;
сульфат амонію, г/л	8;
протиспінювальний засіб, мл/л	1.

Після стерилізації в середовище додатково додають наступні стерильні компоненти:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , г/л	10,0;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , г/л	20,0;
глюкоза, г/л	2,5;
хлорид кальцію, г/л	0,1;
хлорид магнію, г/л	1,0;
цитрат натрію, г/л	0,1;
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, г/л	0,1;
сольовий розчин мікроелементів, мл/л	1,0.

Сольовий розчин мікроелементів готують розчиненням у воді для одержання 1л розчину, г:

Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15;
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,50;

CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,70;
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,25;
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,60;
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,30.

Додавання мікроелементного сольового розчину здійснюють після його стерильної фільтрації. Вихідний об'єм рідини складає 8,4л. Кількість вищевказаних компонентів визначається, виходячи з цього значення.

У цей розчин додають 160мл культури для інокуляції (OD=10 в середовищі SVY (середовище SVY: розчинити в 740мл води, г:

телячий інфузійний бульйон Difco	25;
дріжджовий екстракт Difco	5;
глутамат натрію	5;
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,7;

стерилізувати; додати 200мл стерильного 1М розчину K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7) та 60мл стерильного 50% розчину глюкози (кінцевий об'єм 1л)) *Bacillus subtilis* PA824 і проводять ферментацію при температурі 43°C при інтенсивному перемішуванні при швидкості аерації 12л/хв. Цей штам описаний у заявці [PCT/US, 00/25993].

Протягом 52год. у розчин додають 6л стерильного водного розчину наступного складу:

глюкоза, г/л	500,0;
сульфат кальцію, г/л	0,6;
сольовий розчин мікроелементів, мл/л	7,0.

Процес ферментації лімітується по глюкозі. У процесі ферментації значення рН розчину підтримують на рівні 7,2 шляхом додання 25% аміачного розчину або, відповідно, 25% розчину фосфорної кислоти. Аміак одночасно служить як джерело азоту для ферментаційного процесу. Положення регулятора встановлюють таким чином, щоб концентрація розчиненого кисню підтримувалася на рівні 30% від значення насичення. Після припинення подачі джерела вуглецю ферментацію продовжують доти, поки концентрація розчиненого кисню (pO<sub>2</sub>) не досягне 95% від значення насичення. Після цього ферментацію зупиняють і мікроорганізм знищують шляхом нагрівання. Для цього ферментаційний розчин піддають стерилізації протягом 60хв. Ефективність стерилізації перевіряють методом висівання на чашку.

На завершення здійснюють відокремлення клітинної маси шляхом центрифугування. Після

відокремлення клітинної маси концентрація D-пантотенату складає (після 52год. ферментації) 24,7г/л.

Аналогічним чином одержують ферментаційні розчини, в яких без добавки β-аланіну концентрація пантотенової кислоти складає 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 і більше 90г/л.

В отриманий ферментаційний розчин, який піддавали термічній стерилізації та центрифугуванню для видалення клітинної маси, додатково додають D-пантотенову кислоту та розчином сірчаної кислоти доводять до значення 2. Отриманий таким способом розчин або суспензію фільтрують через тонкий шар піску та активованого вугілля. Концентрація D-пантотенової кислоти у фільтраті складає 67,7г/л.

900г цього фільтрату обробляють електродіалізічним способом: в електродіалізаторі (оснащеному мембранами аніоно- та катіонообмінників (типу Neosepta AMX Sb або CMX Sb від Tokuyama Corp.), ефективна поверхня якого складає 1,85дм<sup>2</sup>, та який містить 5 камер, фільтрат знесолюють при початковій густині потоку 29мА/см<sup>2</sup>. Протягом проведення експерименту після досягнення заданої граничної напруги 20V густина потоку поступово зменшується. Температура становить від 33°C до 40°C. Як концентрат додають 0,5% (в/в) розчин хлориду натрію. Цей концентрат (КОНЦ) насичують видаленими з фільтрату (дилюату, ДИЛ) іонами (наприклад, іонами амонію, хлориду, заліза, калію, натрію або фосфату). В електродіалітичну камеру для промивання електродів додають 5% (в/в) розчин сульфату натрію. Під час проведення експерименту при різних значеннях електропровідності розчину дилюату беруть та аналізують проби з камери, що містить дилюат. Результати аналізу представлені у наведеній нижче таблиці, вони показують, що протягом експерименту зазначені вище іони видалюють з дилюату, і таким чином його електропровідність зменшується. Маленькі одновалентні іони, наприклад, іони хлориду, видалюються швидше, ніж об'ємні багатовалентні іони, наприклад, іони фосфату.

Результати аналізу дилюату наведені в даній Таблиці 1.

Таблица 1

Результати аналізу дилюату

	ПТК <sup>1)</sup> , г/л	Іони (лабораторний аналіз), %							
		амоній	Cl	о-фосфат	Ca	Fe	K	Mg	Na
Едикт, 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 ДИЛ 25mS/cm	67,9	0,22	0,65	0,56	0,005	<0,001	0,30	0,002	0,089
4831/00/196 ДИЛ 20mS/cm	70,7	0,16	0,49	0,53	0,004	<0,001	0,23	0,002	0,077
4831/00/196 ДИЛ 15mS/cm	64,1	0,12	0,32	0,54	0,003	<0,001	0,16	0,001	0,063

Продовження таблиці 1

4831/00/196 ДИЛ 10mS/CM	73,2	0,08	0,16	0,48	0,002	<0,001	0,099	0,001	0,047
4831/00/196 ДИЛ 5mS/CM	79,9	0,03	0,04	0,35	0,001	<0,001	0,038	0,001	0,025
4831/00/196 ДИЛ 3mS/CM	75,6	0,02	0,01	0,26	0,001	<0,001	0,016	<0,001	0,015
4831/00/196 кінець ДИЛ	76,0	0,01	<0,01	0,21	<0,001	<0,001	0,009	<0,001	0,010

Примітка: - <sup>\*)</sup> ПТК означає пантотенова кислота.

Значення pH всіх проб дилкату становить 2-3. 771г дилкату містить 76г/л вільної пантотенової кислоти.

Результати показують, що ферментативно одержаний розчин D-пантотенової кислоти електролітичним способом можна успішно звільнити від непотрібних катіонів. Із одержаної знеосоленої D-пантотенової кислоти можна одержати негігроскопічний порошок кальцій-D-пантотенат, як описано у прикладі 2.

#### Приклад 2

У ферментатор об'ємом 14л, оснащений мішалкою й аератором, заливають водне ферментаційне середовище наступного складу, г/л:

дріжджовий екстракт	10;
глутамат натрію	5;
сульфат амонію	8;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,4;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15.

Після стерилізації в середовище додатково додають наступні стерильні компоненти:

глюкоза, г/л	2,5;
хлорид кальцію, г/л	0,1;
хлорид магнію, г/л	1,0;
цитрат натрію, г/л	1,0;
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, г/л	0,01;
сольовий розчин мікроелементів, мл/л	1,0.

Вихідний об'єм рідини складає 5,5л. Кількість вищевказаних компонентів визначають, виходячи з цього значення.

У цей розчин додають 55мл культури для інокуляції (OD =10 в середовищі SVY (середовище SVY: розчинити в 740мл води, г:

телячий інфузійний бульйон Difco	25;
дріжджовий екстракт Difco	5;
глутамат натрію	5;
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,7;

стерилізувати; додати 200мл стерильного 1M розчину K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7) та 60мл стерильного 50% розчину глюкози (кінцевий об'єм 1л)) *Bacillus subtilis* PA824 і проводять ферментацію при температурі 43°C при інтенсивному перемішуванні при швидкості аерації 12л/хв. Цей штам описаний у заявці [PCT/US, 00/25993].

Протягом 48год. у розчин додають 6л стерильного водного розчину наступного складу:

глюкоза, г/л	550,0;
сульфат кальцію, г/л	0,6;
сольовий розчин мікроелементів	6,0.

мл/л

Процес ферментації лімітують по глюкозі. У процесі ферментації значення pH розчину підтримують на рівні 7,2 шляхом додавання 25% аміачного розчину або, відповідно, 25% розчину фосфорної кислоти. Аміак одночасно служить як джерело азоту для ферментаційного процесу. Положення регулятора встановлюють таким чином, щоб концентрація розчиненого кисню підтримувалася на рівні 30% від значення насичення. Після припинення подачі джерела вуглецю ферментацію продовжують доти, поки концентрація розчиненого кисню (pO<sub>2</sub>) не досягне 95% від значення насичення. Після цього ферментацію зупиняють і мікроорганізм знищують шляхом нагрівання. Для цього ферментаційний розчин піддають стерилізації протягом 30хв. Ефективність стерилізації перевіряють методом висівання на чашку.

На завершення здійснюють відокремлення клітинної маси шляхом центрифугування. Після відокремлення клітинної маси концентрація D-пантотенату складає (після 48год. ферментації) 24,1г/л.

Аналогічним чином одержують ферментаційні розчини, в яких без добавки β-аланіну концентрація пантотенової кислоти складає 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 і більше 90г/л.

2817мл отриманого після ферментації розчину змішують з 1183мл розчину D-пантотенової кислоти з концентрацією 178,9г/л і потім нейтралізують 25% аміачним розчином. Потім розчин фільтрують через шар піску та активованого вугілля. Концентрація D-пантотенової кислоти у фільтраті складає 67г/л, причому D-пантотенова кислота, головним чином, представлена у вигляді солей амонію.

Приблизно 720мл цього розчину піддають електродіалітичній обробці, як описано в прикладі 1:

550г отриманого дилкату (із густиною 1,017г/мл) доданням 3,5г 40% суспензії гідроксиду кальцію доводять до значення pH 7,5. В результаті одержують водний розчин D-пантотенату кальцію (551,03г із вмістом D-пантотенату кальцію 40,9г/л).

Отриманий водний розчин D-пантотенату кальцію висушують у лабораторному осушувачі Fa. Niro міні-типу. Температура на вході складає приблизно 200°C, температура на виході 90°C. Розпилення здійснюють з використанням

двокомпонентної насадки під тиском 2бар. Як порошкоутворювальний засіб додають Sipemat 22F.

Отриманий порошковий продукт має наступні характеристики, мас. %:

вода	2,30;
D-пантотенат кальцію	46,10;
амоній	0,60;
калій	0,47;
натрій	1,10.

#### Приклад 3

У ферментатор об'ємом 200л, оснащений мішалкою та аератором, поміщають:

50% дріжджовий екстракт, г	800;
глутамат натрію, г	438;
соєве борошно, г	3200;
сульфату амонію, г	640;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , г	800;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , г	1600;
протиспінювальна присадка	
ТегоKS, мл	50.

Компоненти розчиняють у 70л води і протягом 30хв. стерилізують при температурі 121°C.

Потім додають розчини 1 та 2.

Розчин 1 готують шляхом розчину у 9л води і наступної стерилізації протягом 30хв., г:

Глюкози xH <sub>2</sub> O	1670;
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	10,2;
MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	170,7;

Розчин 2 готують в такий спосіб:

до 800мл розчину стерильно відфільтрованого цитрату заліза, г/л:

цитрат натрію	200;
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	2;

додають 80мл мікроелементного сольового розчину (стерильно відфільтрований). Для одержання 1л мікроелементного сольового розчину додають наступні компоненти, г:

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,15;
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,50;
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	0,70;
CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	0,25;
MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	1,60;
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,30.

У цей розчин додають 2л культури для інюляції (OD=10 в середовищі SVY (середовище SVY: розчинити в 740мл води, г:

телячий інфузійний бульйон Difco	25;
дріжджовий екстракт Difco	5;
глутамат натрію	5;
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,7,

стерилізувати; додати 200мл стерильного 1М розчину K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7) і 60мл стерильного 50% розчину глюкози (кінцевий об'єм 1л)) *Bacillus subtilis* PA668 і проводять ферментацію при температурі 43°C та інтенсивному перемішуванні при швидкості аерації 3м<sup>3</sup>/хв. Цей штам описаний у заявці [US, 60/262,995].

Протягом 48год. у розчин додають приблизно 10л стерильного водного розчину глюкози. Цей розчин готують в такий спосіб: 90кг глюкози xH<sub>2</sub>O розчиняють у 55л води і протягом 30хв. стерилізують. Після цього в розчин додають 300мл мікроелементного сольового розчину (склад дивися вище), а також 3л розчину цитрату заліза

(склад дивися вище). Після цього в розчин додають 1л стерильно відфільтрованого розчину CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, що має концентрацію 90г/л і 2л стерильно відфільтрованого розчину глутамату натрію 375г/л.

Процес ферментації лімітують по глюкозі. У процесі ферментації значення рН розчину підтримують на рівні 7,2 шляхом додання 25% аміачного розчину або, відповідно, 25% розчину фосфорної кислоти. Аміак одночасно служить як джерело азоту для ферментаційного процесу. Положення регулятора встановлюється таким чином, щоб концентрація розчиненого кисню підтримувалася на рівні 30% від значення насичення. Утворення піни контролюють доданням у розчин відповідної кількості протиспінювальної присадки. Після припинення подачі джерела вуглецю ферментація продовжується доти, поки концентрація розчиненого кисню (рО<sub>2</sub>) не досягне 95% від значення насичення. Після цього ферментація зупиняється. Відокремлення клітинної маси здійснюють шляхом сепарації в сепараторі тарілчастого типу. Клітини, що залишилися у надосадовій рідині, знищують шляхом термічної стерилізації. Концентрація D-пантотенату складає (після 48год. ферментації) 13,7г/л. Після сепарації та стерилізації концентрація D-пантотенату складає 10,7г/л. Аналогічним чином одержують ферментаційні розчини, в яких без добавки β-аланіну концентрація пантотенової кислоти складає 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 і більше 90г/л.

3000г приготовленого в такий спосіб ферментаційного розчину піддають наступній обробці: до двох третин розчину при температурі приблизно 10°C додають еквівалентну за концентрацією багатовалентних аніонів кількість хлориду кальцію (40% розчин); до третини розчину, що залишилася, відповідну еквівалентну кількість гідроксиду кальцію (у твердому вигляді). Розчини на ніч поміщають у холодильник і потім шляхом фільтрації під тиском (фільтр Seitz 700) відокремлюють від осаду, що випав. Після цього розчини змішують і доданням ще 10г гідроксиду кальцію при температурі приблизно 10°C змінюють рН розчину з кислого на лужне (рН 8,7) і піддають відстоюванню. Осад, що випав, також відфільтровують.

Потім 1800г отриманого розчину при температурі 35°C піддають знесоленню в трьохкамерній електродіалізній комірці. При цьому ферментаційний розчин пропускають через одну з двох катіонообмінних мембран, що обмежують камеру продукту. З боку катода камера продукту відокремлена від камери концентрату моноселективною катіонообмінною мембраною (Tokuyama Soda, CMS), з боку анода камера продукту відокремлена від камери хлориду кальцію катіонообмінною мембраною (Tokuyama Soda, CMX). Камери концентрату і хлориду кальцію відокремлені одна від одної аніонообмінною мембраною (Tokuyama Soda, AMX). У камеру концентрату додають 750г 0,5% розчину хлориду натрію, а в камеру хлориду

кальцію 900г 3,05% розчину хлориду кальцію. В електродній системі циркулює 0,1М розчин сульфату натрію. Процес проводять гальваностатично при щільності струму 30мА/см<sup>2</sup> в комірці, що складається з п'яти вищеописаних камер загальною площею мембранної поверхні

500см<sup>2</sup> у замкнутому об'ємі. Критерієм припинення процесу було зниження провідності в камері хлориду кальцію до 4мс/см. Результати аналізу катіонного складу розчинів у камері продукту і камері концентрату наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Результати аналізу катіонного складу розчинів у камері продукту і камері концентрату

	PTS, г/л	Іони (лабораторний аналіз), %			
		Ca <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	NH <sup>4+</sup>
5329/01/82 Продукт t=0г	9,27	0,24	0,15	0,65	0,24
5329/01/82 Продукт t=0,83г	9,01	0,43	0,07	0,25	0,06
5329/01782 Концентрат t=0г	0,0	0,0	0,2	0,00	0,0
5329/01/82 Концентрат t=0,83г	0,015	0,02	0,47	0,71	0,29

При цьому зниження концентрації одновалентних іонів складає 51% для натрію, 66% для амонію і 61% для калію. Середній вихід по струму складає 82%. Втрати D-пантотенової кислоти за рахунок попадання в дві сусідні камери складають 0,08% від загальної кількості речовини. Значення pH у камері продукту в процесі діалізу складає від 7 до 7,5, у камері концентрату і хлориду кальцію - приблизно 6. Загальний спад напруги в процесі діалізу зі зменшенням провідності в камері хлориду кальцію збільшувався приблизно від 11 до 16В.

Розчин, який піддавали такому електродіалізу, потім піддають розпилювальному сушінню для одержання кінцевого продукту. Це свідчить про те, що при відповідній попередній обробці можна використовувати електродіаліз у трьохкамерній комірці з моноселективними катіонообмінними мембранами для обміну одновалентних іонів на двовалентні катіони, з метою підвищення ефективності розпилювального сушіння кінцевого продукту.