

(11) **EE 200300407 A**(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C12P 13/02  
A23K 1/00(12) **PATENDITAOTLUS**

(21) Patenditaotluse number: <b>P200300407</b>	(71) Patenditaotleja: <b>BASF Aktiengesellschaft</b> <b>67056 Ludwigshafen, DE</b>
(85) Rahvusvahelise patendi- taotluse siseriiklikku faasi esitamise kuupäev: <b>22.09.2003</b>	(72) Leiutise autorid: <b>Christine Beck</b> <b>Max-Joseph-Strasse 35, 68167 Mannheim, DE</b>
(86) Rahvusvahelise patendi- taotluse number: <b>PCT/EP02/01754</b>	<b>Hans-Peter Harz</b> <b>Am Mönchsbusch 22, 67373 Dubenhofen, DE</b>
(86) Rahvusvahelise patendi- taotluse esitamise kuupäev: <b>20.02.2002</b>	<b>Daniela Klein</b> <b>M 7,2, 68161 Mannheim, DE</b>
(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev: <b>15.12.2003</b>	<b>Martin Leemann</b> <b>Mandelweg 9, 64625 Bensheim, DE</b>
(30) Prioriteediandmed: <b>21.02.2001</b> <b>DE 10108226.6</b>	<b>Markus Lohscheidt</b> <b>Steubenstrasse 88, 68199 Mannheim, DE</b>
	<b>Stefan Bitterlich</b> <b>Von-Goethe-Strasse 26b, 67246 Dirmstein, DE</b>
	<b>Hartwig Voss</b> <b>Weinbietring 19, 67227 Frankenthal, DE</b>
	(74) Patendivolinik: <b>Raivo Matsoo</b> <b>RM Hirvela Patendibüroo OÜ</b> <b>Saku 15, 11314 Tallinn, EE</b>

(54) **Meetod loomasööda lisandina kasutatava D-pantoteenhappe ja/või tema soolade saamiseks**

(57) Leiutis puudutab täiustatud meetodit D-pantoteenhappe ja/või tema soolade saamiseks ja nende kasutamist loomasööda lisandina.

(57) The invention relates to an improved method for the production of D-pantothenic acid and/or salts thereof and use thereof as adjunct for animal feedstuffs.

**Meetod loomasööda lisandina kasutatava  
D-pantoteenhappe ja/või tema soolade saamiseks**

5 Käesolev leiutis puudutab täiustatud meetodit D-pantoteenhappe ja/või tema soolade saamiseks. Samuti puudutab antud leiutis nimetatud ühendite kasutamist loomasööda lisandina.

Koensüüm A biosünteesiraja lähteühendina on D-pantoteenhappe laialt levinud nii looma- kui taimeriigis. Erinevalt inimestest, kes suudavad pantoteenhapet piisavas koguses omandada toidu kaudu, on nii looma- kui taimeriigis sagedasti kirjeldatud D-pantoteenhappe puudulikkusest tingitud vaegnähtusi. Seetõttu omab D-pantoteenhappe  
10 kättesaadavus suurt majanduslikku tähtsust, seda eriti loomasööda tööstuses.

D-pantoteenhappe tavapärase valmistamise meetod põhineb tema keemilisel sünteesil D-pantolaktoonist ja  $\beta$ -alaniini kaltsiumsoolast (*Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6. väljaande elektrooniline versioon, 1999, peatükk "Vitamiinid").  
15 D-pantolaktooni valmistamiseks D- ja L-isomeeride ratseemilisest segust on vajalik kummagi isomeeri töömahukas eraldamine, mis toimub klassikalise meetodi kohaselt vastavate soolade kaudu. Keemilise sünteesi tulemusel saadud kommertsiaalne produkt esineb enamasti D-pantoteenhappe kaltsiumsoola ehk kaltsium D-pantotenaadi kujul.

Võrreldes tavapärase keemilise sünteesiga on mikroorganismidel põhineva biotehnoloogilise valmistamise meetodi eeliseks asjaolu, et nimetatud juhul osutub võimalikuks pantoteenhappe selektiivne (enantiomeeridevaba) süntees kõrgemate organismide jaoks omastatava D-isomeeri kujul. Sellest tingituna puudub viimatinimetatud valmistamise meetodi korral vajadus optiliste isomeeride töömahuka eraldamise järele ratseemilisest segust.  
20

25 Käesolevaks ajaks on teada arvukad mikroorganismidel põhinevad fermentatiivsed meetodid D-pantoteenhappe valmistamiseks. Näitena olgu toodud järgnevad patenditaotlused: EP 0590857, WO 96/33283, US 6013492, WO 97/10340, DE 19846499, EP 1001027, EP 1006189, EP 1006192 ja EP 1006193.

Nii on näiteks patenditaotlustes EP 1006189 ja EP 1001027 kirjeldatud D-pantoteenhappe valmistamise meetod, mille puhul saavutatav D-pantoteenhappe kogus fermentatsiooniseigus ulatub kõige rohkem 1 g/l-ni. Nii madalad pantoteenhappe kogused, mis ei ületa 10% fermentatsiooniseegu kuivkaalust, on ebapiisavad D-pantoteenhapet sisaldavate loomasööda lisandite majanduslikult tasuva valmistamise  
30

seisukohalt. Senikirjeldatud D-pantoteenhappe valmistamise meetodite üheks puuduseks on lisaks asjaolu, et soovitava produkti eraldamiseks fermentatsioonisegust on vajalik suur hulk töömahukaid töötlemisetappe. Senini ei ole välja pakutud ühtegi majanduslikus mõttes tasuvat suuremamahulist valmistamise meetodit.

5 Patenditaotluses DE 10016321 on esitatud fermentatsioonimeetod D-pantoteenhapet sisaldavate loomasööda lisandite valmistamiseks. Antud taotluses toodud meetodi oluliseks puuduseks on aga sarnaselt eelnevalt nimetatud meetoditega see, et majanduslikult tasuvas koguses D-pantoteenhappe valmistamiseks on tingimata vajalik D-pantoteenhappe lähteühendi  $\beta$ -alaniini pidev lisamine fermentatsioonikeskkonda.

10 Ameerika Ühendriikide patenditaotluses 6013492 ja patenditaotluses WO 96/332839 kirjeldatud D-pantoteenhappe eraldamine fermentatsioonikeskkonnast toimub järgneva skeemi kohaselt. Esmalt eemaldatakse fermentatsioonisegust filtreerimise teel lahustumatu materjal (näit. rakukestad), saadud filtraadist seotakse produkt aktiivsöele ja voolutatakse järgnevalt aktiivsütt orgaanilise lahustiga, milleks on eelistatult metanool. Saadud lahus neutraliseeritakse kaltsiumhüdroksiidiga ning D-  
15 pantoteenhape kristalliseeritakse välja samast lahusest. Kirjeldatud lähenemise puudusteks on väärtusliku produkti kadu kristalliseerimisprotsessi käigus ning orgaanilise lahusti kasutamine, mida on produktist raske eemaldada ja mis teeb vajalikuks lahusti töömahuka taaskogumise.

20 Patenditaotlus EP 0590857 kirjeldab fermentatsioonimeetodit D-pantoteenhappe valmistamiseks, mille käigus osutub möödapääsmatuks  $\beta$ -alaniini lisamine mikroorganismi kasvukeskkonda. Biomass eraldatakse fermentatsioonisegust filtreerimise teel, saadud filtraat voolutatakse üle kation- ning seejärel anioonvaheti, neutraliseeritakse kaltsiumhüdroksiidiga, aurutatakse kokku, lisatakse aktiivsüsi, filtreeritakse veelkord ning kristalliseeritakse välja kaltsiumkloriidi lahusest metanoolis. Lisaks D-pantoteen-  
25 happe kaltsiumsoolale sisaldab saadud produkt veel kaltsiumkloriidi molaarses vahekorras 1:1. Kaltsiumkloriidi eemaldamine produktist toimub elektrodialüüsiga, millele järgneb pihustuskuivatamine. Tulenevalt mitmetest töömahukatest etappidest ja orgaaniliste lahustite kasutamisest, ei ole eelnevalt kirjeldatud meetod ei majanduslikust  
30 ega keskkonnakaitselisest aspektist vastuvõetav.

Käesoleva leiutise eesmärgiks on D-pantoteenhapet ja/või tema sooli sisaldava loomasööda lisandi tootmine, samuti D-pantoteenhappe ja/või tema soolade

valmistamine täiustatud meetodi abil, mis oleks vaba eelnevalt osundatud puudustest. Siinjuures on majanduslikest kaalutlustest tulenevalt soovitatav selline valmistamise meetod, mille puhul fermentatsioonisegusse lisatava  $\beta$ -alaniini hulk on eelnevalt kirjeldatud valmistamise meetoditega võrreldes kas palju väiksem või puudub üldse vajadus  $\beta$ -alaniini lisamise järele. Lisaks on soovitatav D-pantoteenhapet toota tema kahevalentsete metallide, eelkõige muldmetallide, sooladena, kuna nimetatud soolad on vastavate ühevalentsete metallide sooladega võrreldes vähem hügrooskoopsed ning ei moodusta seetõttu suuri tükke. See on oluline antud soolade kasutamisel loomasööda lisandina.

10 Käesolevas leiutises esitatud meetod võimaldab antud probleemi lahendamise soovitud viisil.

Käesoleva leiutise objektiks on D-pantoteenhappe ja/või tema soolade valmistamise meetod, mis erineb senikirjeldatust selle poolest, et:

- 15 a) kasutatakse vähemalt ühte sellist D-pantoteenhapet produtseerivat organismi, milles on dereguleeritud pantoteenhappe-(pan)- ja/või isoleutsiin/valiini-(ilv)-biosünteesirada ning mis toodab fermentatsiooni käigus pantoteenhappe sooli vähemalt 2 g/l, kusjuures kasvumeediumisse on lisatud 0 - 20 g/l vaba  $\beta$ -alaniini ja/või mõnda  $\beta$ -alaniini soola,
- 20 b) saadud D-pantotenaati sisaldavale lahusele lisatakse mitmevalentsete kationide sooli, mille tulemusena tekivad D-pantoteenhappe mitmevalentsed soolad,
- c) D-pantoteenhappe mitmevalentseid sooli sisaldavat lahust nanofiltreeritakse, kusjuures filtrile jääv kontsentraat (retentaat) rikastub nimetatud sooladega ning
- 25 d) nimetatud D-pantoteenhappe sooli sisaldava nanofiltratsiooni tulemusel tekkinud kontsentraat kuivatatakse ja/või viiakse nimetatud soolad neile vastava täpse molekulkaaluni.

Käesoleva leiutise ühes variandis on etapi c) käigus tekkivaks kontsentraadiks (retentaadiks) D-pantoteenhappe mitmevalentseid sooli sisaldav suspensioon.

30 Käesoleva leiutise etapis a) kirjeldatud fermentatsiooniprotsess võib aset leida vastavalt erinevatele fermentatsioonitehnikatele nagu *batch*-, *fed-batch*- või korduv *fed-batch*-meetod, samuti pidevfermentatsioon. Fermentatsiooni käigus tekkiva pantoteen-

happe happelise reaktsiooni neutraliseerimiseks võib kasutada selliseid tavapäraseid puhversüsteeme nagu NaOH-, KOH- või ammoniaagi lahusega kindla pH väärtuseni tiitritud fosfaatpuhver.

Lisaks võib käesoleva leiutise ühe variandina etapis a) toota fermentatsiooni käigus D-pantoteenhappe soolasid vähemalt koguses 10 g/l, eelistatult vähemalt 20 g/l, veel eelistatavamalt vähemalt 40 g/l, iseäranis eelistatult vähemalt 60 g/l või isegi vähemalt 70 g/l.

Käesolevas leiutises tarvitatuna tähendavad terminid "produtseerima" või "tootma" seda, et mikroorganism suudab toota D-pantoteenhapet ja/või tema sooli suuremas koguses kui see oleks vajalik tema enda ainevahetuse jaoks. Käesoleva leiutise ühe eelistatava variandi kohaselt ei jää organismi poolt sünteesitud D-pantoteenhape ja/või tema soolad raku sisemusse, vaid väljutatakse organismi poolt täielikult kasvukeskkonda. Nimetatud ühendite väljutamine võib toimuda nii aktiivse kui passiivse transpordi mehhanismide vahendusel.

Vastavalt käesolevas leiutises kirjeldatud meetodile toimub D-pantoteenhappe tootmine mikroorganismide abil. Mikroorganismideks võivad käesolevas leiutises olla seened, pärmid ja/või bakterid. Eelistatult on kasutatavateks seenteks näiteks hallitusseened või pärmid nagu *Saccharomyces* või *Debaromyces*, pärmide puhul eelistatult *Saccharomyces cerevisiae*. Bakteritest leiavad käesolevas leiutises eelistatult kasutust korüüneformsed bakterid või sugukonna *Bacillus* bakterid. Eelistatud bakteriteks on ka näiteks sugukonda *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Acinetobacter* või *Rhizobium* kuuluvad bakterid. Iseäranis eelistatud bakteriteks on käesolevas leiutises *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium breve* või *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. lentimorbus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. panthothenicus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. pumilius*, *B. thuringiensis*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus* ning teised 1. rühma *Bacilluse* perekonna bakterid või *Actinum mycetalis*, kusjuures konkreetne mikroorganism on identifitseeritud näiteks 16S rRNA järjestuse põhjal.

Lisaks sellele hõlmab käesolev leiutis geneetiliselt muundatud mikroorganismide kasutamist D-pantoteenhapet ja/või tema sooli sisaldava loomasööda lisandite valmistamisel. Selliste geneetiliselt muundatud organismide saamine võib toimuda näiteks

keemilise mutageneesi teel, kusjuures tekkinud mutandid selekteeritakse järgnevalt sobiva skriinimismeetodi abil. Käesolevas leiutises kirjeldatud meetod hõlmab ka nn. "produktsoonitüvesid", mis on sobivad antud leiutises soovitud produkti valmistamiseks ning mille ainevahetus on sisseviidud geneetiliste modifikatsioonide tõttu kallutatud suurema D-pantoteenhappe sünteesi suunas. Nimetatud geneetilised modifikatsioonid hõlmavad ka mehhanisme, mille kaudu toimub D-pantoteenhappe ja/või tema soolade väljutamine läbi rakumembraani. See on saavutatav vastavate ainevahetusradade regulatsioonipunktide modifitseerimise kaudu antud mikroorganismis.

Mõeldav on ka transgeensete organismide kasutamine, mille saamine põhineb homoloogilisel ja/või heteroloogilisel rekombinatsioonil soovitud produkti sünteesiks vajalike nukleiinhappe järjestuste vahel. Võimalik on nii ühe kui rohkema geeni üleekspressioon ja/või deregulatsioon, seda nii üksikult kui kombineerituna, kusjuures antud geen või geenid võivad paikneda nii kõnesoleva organismi genoomis kui kunstlikul vektoril.

Sellised transgeensed organismid sisaldavad eelistatult lisakoopiaid geenidest *panB*, *panC* ja *panD* ja/või nimetatud gene insenergeneetiliselt modifitseeritud kujul. Samuti võivad nimetatud geenid esineda kombineeritult ja/või terve geeniekspressiooni üksusena nagu näiteks *panBCD*-operon. Lisaks on võimalik ka organismi teiste ainevahetusradade, näiteks isoleutsiini-valiini biosünteesiraja, modifitseerimine. Viimast on kirjeldatud näiteks patenditaotlustes EP 1006189, EP 1006192, EP 1006193 või EP 1001027. Isoleutsiini-valiini biosünteesiraja modifitseerimine suurendab pantoteenhappe biosünteesil vajaminevate hargnenud ahelaga eellasmolekulide taset rakus. Eelistatult toimub sellisel juhul nimetatud biosünteesiraja geenide nagu *ilvB*, *ilvN*, *ilvC* ja/või *ilvD* üleekspressioon.

Lisaks eelnevale hõlmab käesolev leiutis ka insenergeneetilisi modifikatsioone pantoteenhapet tootva mikroorganismi aspartaadi- $\alpha$ -dekarboksülaasi geenis, näiteks selle üleekspressiooni või deregulatsiooni.

Termin "deregulatsioon" tähendab käesolevas patenditaotluses järgnevat: modifikatsioonide sisseviimine vähemalt ühte biosünteesilist ensüümi kodeerivasse geeni, kusjuures selle tulemusena nimetatud ensüümi aktiivsus mikroorganismis muutub. Eelistatult on antud geeni modifitseerimise tulemuseks kas tema poolt kodeeritud biosünteesilise ensüümi ekspressioonitaseme tõus või suurenenud aktiivsus. Mõiste "deregulatsioon"

leeritud ainevahetusrada" hõlmab ka sellist biosünteesilist ainevahetusrada, kus on modifitseeritud rohkem üks ensüümi kodeeriv geen ning selle tulemusena on muutunud rohkem kui ühe ensüümi aktiivsus.

Järgnevas on toodud loetelu mõningatest insenergeneetilistest modifikatsioonidest, mis ei ole aga sugugi ammendav. Modifikatsioonid võivad seisneda järgnevas: endogeense promootori või regulaatorsete elementide eemaldamine; tugevate, indutseeritavate või suurema hulga promootorite sisse viimine huvipakkuva geeni ette; regulaatorsete järjestuste eemaldamine, mis toob kaasa muutuse huvipakkuva geeni ekspressioonis; geeni asukoha muutmine kromosoomil; DNA järjestuse muutmine geeni vahetus ümbruses või geenis endas, näiteks ribosoomile seondumise piirkonnas (RBS); antud geeni koopiaarvu tõstmine genoomis või erineva koopiaarvuga plasmiidide sisseviimine organismi; antud geeni transkriptsioonil või transkriptsiooni käigus tekkinud mRNA translatsioonil osalevate valkude (näit. regulaatorvalkude, supressorvalkude, transkriptsiooni aktivaatorvalkude ja muu sarnase) modifitseerimine. Siia kuuluvad ka kõik teised tänapäeval kasutatavad geeniekspressiooni dereguleerimise meetodid nagu näiteks *antisense* oligonukleotiidide kasutamine või repressorvalkude blokeerimine.

Deregulatsioon võib samuti hõlmata modifikatsioone geenide kodeerivates piirkondades, mille tulemuseks on geeniproducti suurenemine või vähenemine eriaktiivsus või negatiivse allosteerilise tagasiside regulatsiooni kadu geeniproductile.

Lisaks on käesolevas leiutises eelistatud biosünteesiliste ensüümide selline insenergeneetiline modifitseerimine, mis mõjutab pantoteenhappe biosünteesil esinevate prekursorite kasutamist teistes biosünteesiradades ja/või tekkinud pantoteenhappe kasutamist koensüüm A biosünteesil. Selliseid ensüüme kodeerivate geenide näiteks on: *alsD*, *avtA*, *ilvE*, *ansB*, *coaA*, *coaX* ja mitmed teised geenid. Toodud loetulu on üksnes näitlik ning käesolev leiutus ei pea nendega piirduma.

Samuti on eelistatud geneetilised modifikatsioonid, mis kindlustavad rakuliste kofaktorite (näit. metüleentetraahüdrofolaat, NaDPH/NADP jm.) sünteesi pantoteenhappe produktsiooni jaoks optimaalsel tasemel.

Eelistatult on geneetiliselt muundatud mikroorganismides enestes sünteesitud  $\beta$ -alaniini tase kõrgem kui vastavates mittemodifitseeritud organismides ning seetõttu puudub erinevalt leiutisest EP-A-0590857 vajadus teda lisada prekursorina kasvumediumisse. Eelistatud on mikroorganismid, mis sisaldavad dereguleeritud pantoteenhappe

(pan) ja/või isoleutsiin-valiin (ilv) biosünteesirada. Kasuks tuleb ka ketopantoaadi reduktaasi (*panE*) üleekspressioon kasutatavates mikroorganismides.

Samuti on käesoleva leiutise seisukohast kasulik võimaluse korral alandada koensüüm A biosünteesiks vajaliku *coaA* geeni produkti aktiivsust või (näiteks *Bacilluse* perekonna mikroorganismides) see üldse välja lülitada. *Bacilluse* perekonna bakterid sisaldavad nimelt *coaA* geenile lisaks veel ühte sama biosünteetilise funktsiooniga ensüümi kodeerivat geeni (*coaX*). Sarnaselt *coaA*-le võib modifitseerida ka *coaX* geeni või sellele geenile vastavat valku, kusjuures eelistatud on ekspressioonitaseme/aktiivsuse alandamine või antud geeni väljalülitamine. Seejuures peab aga *coaA* omama küll  
5 vähenenud, ent siiski piisavat aktiivsust, s.t modifikatsioonid ei tohi *coaA* aktiivsust täielikult kaotada. Lisaks erinevate geenide üleekspressioonile tuleb kõne alla ka antud geenide promootorpiirkondade insenergeneetiline modifitseerimine, mille tulemuseks on geeniproductide üleekspressioon.

Ühes käesoleva leiutise rakendustest leiavad kasutust patenditaotluses  
15 PCT/US00/25993 kirjeldatud bakteritüved nagu näiteks *Bacillus subtilis* PA824 või temast lähtuvad tüved. Ühes käesoleva leiutise edasistest rakendustest kasutatakse mikroorganismi *Bacillus subtilis* tüve PA668 nagu kirjeldatud Ameerika Ühendriikide patenditaotluses nr 60/262995. Nende *Bacillus subtilise* tüvede PA824 ja PA668 valmistamine toimus järgnevalt:

20 *Bacillus subtilise* lähtetüvest 168 (Marburgi tüvi ATCC 6051) genotüübiga *trpC* ( $\text{Trp}^-$ ) tekitati  $\text{Trp}^+$  markeri ülekandega *Bacillus subtilise* metsik-tüüpi tüvest W23 tüvi PY79. Tüves PY79 tekitati tavapäraste insenergeneetiliste meetoditega (vt. näiteks Harwood, C.R. ja Cutting, S.M. (toimetajad): Molecular Biology Methods for *Bacillus* (1990) John Wiley & Sons, Ltd, Chicester, Suurbritannia)  $\Delta\text{panB}$  ja  $\Delta\text{panE1}$   
25 mutatsioonid.

Saadud tüve transformeeriti *Bacillus subtilise* tüve PA221 genoomse DNA (genotüüp  $P_{26\text{panBCD}}$ , *trpC2* ( $\text{Trp}^-$ )) ja *Bacillus subtilise* tüve PA303 (genotüüp  $P_{26\text{panE1}}$ ) genoomse DNA-ga. Transformatsiooni tulemusena tekkinud tüvi PA327  
30 10 ml kultuuris 5 g/l lisatud  $\beta$ -alaniini ja 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovaleraati sisaldaval SVY-meediumil kasvatades (25 g/l Difco vasika infusiooniekstrakti, 5 g/l Difco pärmi-ekstrakti, 5 g/l naatriumglutamaati, 2,7 g/l ammoniumsulfaati 740 ml vees; lahus



autoklaaviti ning lisati 200 ml 1 M kaaliumfosfaati ja 60 ml steriliseeritud 50% glikoosilahust ) andis *Bacillus subtilise* tüvi PA 327 24 tunni jooksul pantoteenhappe tiitriks 3,0 g/l.

*Bacillus subtilise* tüve PA 221 (genotüüp genotüüp P<sub>26</sub>panBCD, trpC2 (Trp<sup>-</sup>))  
5 valmistamine toimus nii, nagu kirjeldatud järgnevas lõigus.

Tavaliste insenergeneetiliste meetoditega ning kasutades infot *E.coli* panBCD operoni järjestuse kohta (vt. Merkel jt, FEMS Microbiol. Lett., 143, 1996:247-252), kloneeriti, lähtudes *Bacillus subtilise* tüve GP275 plasmiidsest raamatukogust, *Bacilluse* panBCD operon. Kloneerimisel kasutati *E.coli* tüve BM4062 (bir<sup>ts</sup>) ning asjaolu, et  
10 *Bacilluse* operon asub birA geeni läheduses. panBCD operon sisestati *E.coli* replikatsioonivõimelisse plasmiidis. panBCD operoni ekspressiooni võimendamiseks kasutati *Bacillus subtilise* faagi SP01 (P<sub>26</sub>) tugevaid konstitutiivseid promootoreid ja asendati panB geeni ribosoomile seondumise järjestus (RBS) vastava kunstliku järjestusega. P<sub>26</sub>panBCD kasseti ette plasmiidis ligeeriti DNA fragment, mis asub  
15 *Bacilluses* vahetult eespool natiivset panB geeni. See plasmiid transformeeriti *Bacillus subtilise* tüvesse RL-1 (klassikalise mutageneesi teel saadud derivaat *Bacillus subtilise* tüvest 168 (Marburgi tüvi ATCC 6051) genotüübiga trpC2 (Trp<sup>-</sup>)) ning asendati natiivne panBCD operon homoloogilise rekombinatsiooni teel p<sub>26</sub>panBCD operoniga. Saadi tüvi PA221 genotüübiga P<sub>26</sub>panBCD, trpC2 (Trp<sup>-</sup>). *Bacillus subtilise* tüvi PA221 andis  
20 kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY-kasvumeediumil, kuhu oli lisatud 5 g/l β-alaniini ja 5 g/l α-keto-isovaleraati, pantoteenhappe tiitriks 24 tunni jooksul kuni 0,92 g/l.

*Bacillus subtilise* tüve PA303 (genotüüp P<sub>26</sub>panEI) valmistamine toimus nii, nagu kirjeldatud järgnevas lõigus.

*E.coli* panE geeni järjestuse abiga kloneeriti *Bacilluse* panE järjestuse analoog.  
25 Osutus, et *B.subtilises* eksisteerivad kaks *E.coli* panE geeni homoloogi, mis tähistati vastavalt panE1 ja panE2. Deletsioonanalüüs näitas, et panE1 geen vastutab 90% pantoteenhappe sünteesi eest, samas kui panE2 geen ei omanud mingit märkimisväärset mõju pantoteenhappe produktsioonile. Ka siin asendati analoogselt panBCD operoni kloneerimisele vastavate geenide promootorid tugeva konstitutiivse promootoriga P<sub>26</sub>  
30 ning panEI geeni ees asuv ribosoomile seondumise piirkond kunstliku järjestusega. P<sub>26</sub>panEI fragment kloneeriti vektorisse, mis oli konstrueeritud nii, et nimetatud fragment võiks integreeruda panEI lookusesse *Bacillus subtilise* genoomis.

Transformatsiooni ja homoloogilise rekombinatsiooni tulemusena saadi tüvi PA303 genotüübiga  $P_{26}panE1$ . *Bacillus subtilise* tüvi PA303 andis kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY-kasvumeediumil, kuhu oli lisatud 5 g/l  $\beta$ -alaniini ja 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovaleraati, pantoteenhappe tiitriks 24 tunni jooksul kuni 1,66 g/l.

5 Edasiste tüvede konstrueerimine toimus läbi tüve PA327 transformeerimise plasmiidiga, mis sisaldas  $P_{26}ilvBNC$  operoni ja spektinomütsiinile resistentsust tagavat markergeeni. Nagu kinnitas kontroll PCR-ga, oli  $P_{26}ilvBNC$  operon integreerunud *amyE* lookusesse. Üks saadud transformantidest tähistati PA340-ga (genotüüp  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  $P_{26}ilvBNC$ , *specR*, *trpC2* (Trp<sup>-</sup>)).

10 *Bacillus subtilise* tüvi PA340 andis kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY-kasvumeediumil, kuhu oli lisatud ainult 5 g/l  $\beta$ -alaniini, pantoteenhappe tiitriks 24 tunni jooksul kuni 3,6 g/l. PA340 kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY-kasvumeediumil, kuhu oli lisatud 5 g/l  $\beta$ -alaniini ja 5 g/l  $\alpha$ -ketoisovaleraati, tõusis pantoteenhappe tiiter 24 järel kuni 4,1 g/l.

15 Edasiste manipulatsioonide käigus viidi tüvesse PA340 dereguleeritud *ilvD*-kassett. Selleks transformeeriti tüvesse PA340 plasmiid, mis sisaldas  $P_{26}$  promootori kontrolli all olevat *ilvD* geeni, kuhu oli lisaks kunstlik ribosoomile seondumise järjestus RBS2. Homoloogilise rekombinatsiooni tulemusena integreerus  $P_{26}ilvD$  geen algsesse *ilvD* lookusesse. Tulemuseks saadi tüvi PA 374 genotüübiga  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  
20  $P_{26}ilvBNC$ ,  $P_{26}ilvD$ , *specR* ja *trpC2* (Trp<sup>-</sup>).

*Bacillus subtilise* tüvi PA374 andis kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY-kasvumeediumil, kuhu oli lisatud ainult 5 g/l  $\beta$ -alaniini, pantoteenhappe tiitriks 24 tunni jooksul kuni 2,99 g/l.

Saavutamaks tüves PA374 pantoteenhappe produktsiooni ilma  $\beta$ -alaniini  
25 lisamiseta kasvukeskkonda, viidi antud tüvesse aspartaadi- $\alpha$ -dekarboksülaasi kodeeriva geeni *panD* lisakoopiad. Selleks transformeeriti tüve PA401 kromosomaalne DNA tüvesse PA374. Selekteerides transformante resistentsuse järgi tertratsükliinile, saadi tüvi PA377 järgneva genotüübiga:  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  $P_{26}ilvBNC$ ,  $P_{26}ilvD$ , *specR* ja *trpC2* (Trp<sup>-</sup>).

30 *Bacillus subtilise* tüvi PA377 andis kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY-kasvumeediumil, kuhu polnud lisatud ühtegi biosünteesilist prekursorit, pantoteenhappe tiitriks 24 tunni jooksul kuni 1,31 g/l.

*Bacillus subtilise* tüve PA401 (genotüüp  $P_{26}panD$ ) valmistamine toimus nii, nagu kirjeldatud järgnevas lõigus.

*Bacillus subtilise panD* geen kloneeriti *panBCD* operonist tetratsükliinile resistentsust kodeerivat markergeeni sisaldavasse vektorisse. *panD* geeni ette kloneeriti  $P_{26}$  promootor ning eelnevalt kirjeldatud kunstlik RBS. Vektori töötlemisel restriктаasiga saadi fragmendid, mis sisaldasid tetratsükliini resistentsusgeeni ja  $P_{26}panD$  geeni. Nimetatud fragmendidi religeeriti ning transformeeriti nendega eelnevalt kirjeldatud tüve PA221. Antud fragmendi integreerumisel tüve PA221 genoomi saadigi tüvi PA401 genotüübiga  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panD$ , tetR ja trpC2 (Trp<sup>-</sup>).

*Bacillus subtilise* tüvi PA401 andis kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY-kasvumeediumil, kuhu oli lisatud 5 g/l  $\alpha$ -ketoiovaleraati, pantoteenhappe tiitriks 24 tunni jooksul kuni 0,3 g/l. 10 ml kultuurides SVY-kasvumeediumil, kuhu oli lisatud 5 g/l D-pantoiinhapet ja 10 g/l L-asparagiinhapet, saadi pantoteenhappe tiitriks 24 tunni jooksul kuni 2,2 g/l.

Tüvest PA377 tekitati transformatsiooni teel tüve PY79 kromosomaalse DNA-ga trüptofaani suhtes prototroofne tüvi. See tüvi PA824 omas järgnevat genotüüpi:  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  $P_{26}ilvBNC$ ,  $P_{26}ilvD$ , specR, tetR ja Trp<sup>+</sup>.

*Bacillus subtilise* tüvi PA824 andis kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY kasvumeediumil, kuhu polnud lisatud ühtegi biosünteesilist prekursorit, pantoteenhappe tiitriks 48 tunni jooksul kuni 4,9 g/l (võrdluseks: sama ajaga tootis tüvi PA377 kuni 3,6 g/l pantoteenhapet).

Tüve PA668 valmistamine toimus nii, nagu on kirjeldatud järgnevas lõigus.

*Bacilluse panD* geen kloneeriti metsik-tüüpi *panBCD* operonist ning sisestati vektorisse, mis lisaks kloramfenikooli resistentsusgeenile sisaldas ka *B.subtilise vpr* lookust.

Tugev konstitutiivne promootor  $P_{26}$  sisestati *panD* geeni 5'otsa ette. Vektori lõikamisel restriктаasiga saadi fragmendid, mis sisaldasid  $P_{26}panB$  geeni, kloramfenikoolile resistentsust tagavat markergeeni ning *Bacillus subtilise vpr* järjestust. Isoleeritud fragmendid religeeriti ning transformeeriti nendega tüve PA824. Saadi tüvi PA668 genotüübiga  $P_{26}panBCD$ ,  $P_{26}panE1$ ,  $P_{26}ilvBNC$ ,  $P_{26}ilvD$ ,  $P_{26}panB$ , specR, tetR, CmR ja Trp<sup>+</sup>.

Isoleeriti tüve PA668 kaks kolooniat, mis tähistati vastavalt PA668-2A ja

PA668-24.

*B. subtilise* tüvi PA824 andis kasvatamisel 10 ml kultuuris SVY kasvumeediumil, kuhu polnud lisatud ühtegi biosünteesilist prekursorit, pantoteenhappe tiitriks 48 tunni jooksul kuni 1,8 g/l. 10 ml kultuurides, kuhu oli lisatud 10 g/l L-asparagiinhapet, 5 ulatusid tiitrid kuni 4,9 g/l.

Kõigi tüvede konstrueerimise täpne meetod on esitatud patenditaotlustes PCT/US00/25993 ja US nr 60/262995.

Eelnevalt kirjeldatud tüvi PA377 annab fermentatsioonil, kus limiteerivaks ühendiks on glükoos, 10 l SVY-kasvumeediumis (25 g/l Difco vasika infusioonilahust, 10 5 g/l Difco pärmiekstrakti, 5 g/l trüptofaani, 5 g/l naatriumglutamaati, 2 g/l ammoniumsulfaati, 10 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l naatriumtsitraati, 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ja 1 ml/l järgneva koostisega mikroelementide lahust: 0,15 g/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,7 g  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - kõik lahustatud 1 l vees) glükoosi lahuse 15 pideva lisamisega 36 (resp.48) tunni jooksul pantoteenhappe koguseks fermentatsioonisegus 18 - 19 g/l (22 - 25 g/l).

Glükoosi limitatsiooniga fermentatsioonil 10 l pärmiekstrakti põhineval kasvumeediumil (10 g/l Difco vasikaekstrakti, 5 g/l naatriumglutamaati, 8 g/l ammoniumsulfaati, 10 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l naatriumtsitraati, 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ning 1 ml/l eelnevalt kirjeldatud mikroelementide lahust) 20 andis tüvest PA377 tekitatud trüptofaani suhtes prototroofne tüvi PA824 glükoosi lahuse pideval lisamisel 36, 48 ja 72 tunnise kasvatuse järel pantoteenhappe tiitriks fermentatsioonisegus vastavalt kuni 20 g/l, 28 g/l ja 36 g/l.

Kasvumeediumi koostise edasisel optimiseerimisel andis tüvi PA824 glükoosi 25 limitatsiooniga fermentatsioonil 10 l kasvumeediumil glükoosi pideva lisamisega 36 (resp.48) tunni jooksul pantoteenhappe koguseks fermentatsioonikeskkonnas 37 g/l (resp.48 g/l). Optimiseeritud fermentatsioonisegu oli järgneva koostisega: 10 g/l Difco pärmiekstrakti, 10 g/l NZ amine A-d (Quest International GmbH, Erfstadt), 10 g/l naatriumglutamaati, 4 g/l ammoniumsulfaati, 10 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g/l 30  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/l naatriumtsitraati, 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ning 1 ml/l eelnevalt kirjeldatud mikroelementide lahust.

Pantoteenhappe kontsentratsiooni edasiseks tõstmiseks fermentatsioonisegus on

mõeldav kasvumeediumi koostise edasine optimeerimine, fermentatsiooniaja pikendamine, tüvede ja muude protseduuride täiustamine ja üksikute etappide kombineerimine. Nii on võimalik fermentatsiooni käigus eelnevalt kirjeldatud pantoteenhappe koguste saavutamine tüvest PA824 pärinevate tüvedega. Selliste tüvede tekitamiseks võib kasutada nii klassikalisi mikrobioloogilisi tehnikaid kui insengeneetilisi manipulatsioone. Kasvukeskkonna koostise, kasutatavate tüvede ja fermentatsiooniprotsesside täiustamine võimaldab tõsta pantoteenhappe tiitri fermentatsioonikeskkonnas üle 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ja >90 g/l.

Üks käesoleva leiutise olulisemaid eeliseid on asajolu, et fermentatsiooniprotsess toimub kasvumeediumis, kuhu peale vähemalt ühe üldise süsiniku- ja lämmastikuallika pole lisatud muid biosünteesilisi prekursoreid. Seega ei vaja D-pantoteenhappe biosüntees teisi eellasmolekule/prekursoreid. Selliste prekursoritena mõistetakse käesolevas leiutises ühendeid nagu  $\beta$ -alaniin ja/või L-asparagiinhape ja/või L-valiin ja/või  $\alpha$ -ketoisovaleraat ja/või nende kombinatsioonid.

Ühes käesoleva leiutise eelistatud variandis toimub D-pantoteenhapet produtseeriva organismi fermenteerimine kasvumeediumis, mis sisaldab ühte üldist süsiniku- ja lämmastikuallikat, kuid kuhu ei ole eelnevalt lisatud ega ei lisata fermentatsiooniprotsessi käigus vaba  $\beta$ -alaniini ja/või tema sooli. Seega ei ole käesolevas leiutises vajalik vaba  $\beta$ -alaniini ega tema soolade lisamine, et toota D-pantoteenhapet vähemalt 10 g/l kasvumeediumi kohta, eelistatult vähemalt 20 g/l, eelistatavamalt vähemalt 40 g/l, eriti eelistatult 60 g/l ja iseäranis eelistatult 70 g/l.

$\beta$ -alaniini ja/või  $\beta$ -alaniini soolade lisamine ei ole käesolevas leiutises siiski välistatud ning D-pantoteenhappe saagist on võimalik  $\beta$ -alaniini ja/või  $\beta$ -alaniini soolade lisamise läbi veelgi tõsta. Eeldades näiteks, et kõik pantoteenhappe biosünteesiks vajalikud prekursorid esinevad rakus piisavas koguses ning et piiravaks teguriks pantoteenhappe produktsioonil on üksnes *panD* geeni produkti ebapiisav aktiivsus, võib pantoteenhappe saagist  $\beta$ -alaniini ja/või  $\beta$ -alaniini soolade lisamise teel veel 50% võrra tõsta.

Ühe käesoleva leiutise eelistatud variandi kohaselt võib pantoteenhappe saagist tõsta enam kui 50% võrra, lisades kasvukeskkonda kuni 20 g/l  $\beta$ -alaniini ja/või  $\beta$ -alaniini sooli. Eelistatud on  $\beta$ -alaniini ja/või  $\beta$ -alaniini soolade lisamine kasvukeskkonda ligikaudu koguses 15 g/l.

Eelnevalt mainitud mikroorganismide fermentatsioonil kasutatavateks süsinikuallikateks on käesolevas leiutises sobivad näiteks tärklise hüdroolüsaadist pärit sahhariidid (mono-, di- ja oligosahhariidid), eelistatult glükoos või sahharoos, samuti peedisuhkur või roosuhkru melass, valgud, valguhüdroolüsaadid, sojajahu, maisivedelik, rasvad, vabad rasvhapped, eelnevatest fermentatsioonidest allesjäänud rakumass või selle hüdroolüsaat, samuti pärmiekstrakt. Käesolev leiutis ei piirdu siiski eeltoodud loeteluga.

Käesoleva leiutise üheks lisaeeliseks on asjaolu, et suhkru kogus kasvukeskkonnas püsib kuni fermentatsiooni lõpuni minimaalsel tasemel. Liiga suur suhkru kogus kasvukeskkonnas võib raskendada fermentatsioonilahuse järgnevat kuivatamist ja/või sattuda lõpp-produkti koostisesse. Suhkru koguse hoidmine minimaalsel tasemel võib käesolevas leiutises toimuda nii, et fermentatsiooniprotsessi hoitakse käigus veel mõni aeg peale süsinikuallika äratarvitamist (*batch*-reaktoris kasvatamise korral) või peale süsinikuallika lisamise lõpetamist (*fed-batch*- või korduv *fed-batch*-reaktoris kasvatamise korral) ja/või reguleerides segu lisamist nii, et süsinikuallika kontsentratsioon lisatavas segus jääb nullilähedaseks.

Selle saavutamiseks jätkatakse peale süsinikuallika (näit. suhkrulahuse) lisamise lõpetamist fermentatsiooniprotsessi seni, kuni lahustunud hapniku kontsentratsioon ( $pO_2$ ) ulatub vähemalt 80%-ni vastavast küllastavast kontsentratsioonist antud tingimustel, eelistatult aga 90%-ni ja veelgi eelistatavamalt 95%-ni vastavast väärtusest.

Sobivateks lämmastikuallikateks on käesolevas leiutises näiteks ammoniaak, ammooniumsulfaat, urea, valgud, valguhüdroolüsaadid või pärmiekstrakt. Ka siin ei piirdu käesolev leiutis toodud loeteluga.

Fermentatsioonisegu sisaldab lisaks veel mineraalsooli ja/või mikroelemente nagu aminohapped ja vitamiinid. Vastavaid fermentatsioonisegusid on teada mitmeid ning nende täpne koostis ja valmistamisviis on asjatundjale kättesaadav.

Peale fermentatsioonikeskkonna inokuleerimist sobiva D-pantoteenhapet tootva organismiga (asjatundja jaoks teadaoleva rakkude tihedusega) ja võimaluse korral ka vahutamist vähendava lisandi lisamist keskkonda, käivitub antud organismi kultiveerimine. Fermentatsioonikeskkonna pH-väärtust võib vajaduse korral reguleerida erinevate anorgaaniliste ja orgaaniliste aluste või hapetega nagu näiteks KOH, NaOH, ammoniaak, fosforhape, väävelhape, soolhape, sipelghape, merevaikhape, sidrunhape

jms.

Tulenevalt fermentatsioonil kasutatavast puhversüsteemist, mille komponentideks võivad olla KOH, NaOH, ammoniak, fosforhape, väävelhape, soolhape, sipelghape, merevaikhape, sidrunhape jpt., esineb tekkinud D-pantoteenhape oma  
5 fermentatsioonikeskkonnas kasutatavale puhversüsteemile vastava(te) soola(de) kujul. Kuivõrd käesoleva leiutise seisukohalt on D-pantoteenhappe ühevalentsete metallide soolad ebasoovitavad, vabanetakse käesolevas leiutises nimetatud sooladest nanofiltratsiooni teel.

Selleks lisatakse tekkinud D-pantoteenhappe lahusele esmalt mitmevalentsete  
10 katioonide sooli, mille tulemusena tekivad D-pantoteenhappe vastavate katioonide soolad. Käesolevas leiutises võib mitmevalentseid katioone sisaldavaid sooli lahusele lisada nii tahkel kujul kui vesilahusena, kusjuures nimetatud soolade lisamine toimub etapis a) kas fermentatsiooniprotsessi käigus, fermentatsiooniprotsessi lõppedes (eelistatult) või pärast fermentatsiooni. Mitmevalentseid katioone sisaldavat vesilahust  
15 võib fermentatsioonisegusse lisada ka pidevalt.

Lisaks võib käesolevas leiutises etapis c) toimuvale nanofiltratsioonile eelneada rakumassi või fermentatsioonilahusest välja sadenenud komponentide eemaldamine. See võib toimuda nii fermentatsioonilahuse dekanteerimise kui membraanfiltratsiooni, eelistatult ultrafiltratsiooni teel. Membraanfiltratsiooni ühe variandina võib käesolevas  
20 leiutises kasutada diafiltratsiooni. Ka nimetatud etapis võib D-pantoteenhapet sisaldava fermentatsioonilahuse membraanfiltratsioonile järgneda või sellega samaaegselt toimuda mitmevalentsete katioonide soolade lisamine tahkel kujul või vesilahusena. Näiteks võib nimetatatud katioonide lahuse lisamine toimuda pidevalt.

Rakumassi ja/või lahusest välja sadenenud komponentide (näiteks lahustumatud  
25 fosfaat- resp. sulfaatsoolad, ensüümid, hormoonid, valgud, antibiootikumid, pürogeenid, viirused, polüsahhariidid, kolloidosakesed, tensiidid, pestitsiidid ja teised orgaanilised ühendid) eemaldamiseks võib kasutada raskusjõudu, tsentrifugaaljõudu, rõhusurvet või vaakumit. Kasutatavateks meetoditeks on näiteks dekanteerimine, elutriatsioon, sõelumine, sorteerimine, filtreerimine, dialüüs, sedimentatsioon, mikrofiltratsioon, ultrafiltratsioon, flotatsioon, vahtfraksioneerimine, klaarimine, tsentrifuugimine või  
30 sadestamine. Membraanfiltratsioon hõlmab nii membraani eri poolte vahel eksisteerival rõhkude vahel põhinevat segu filtreerimist läbi membraani kui ka ultrafiltratsiooni.

Nimetatud meetodite erinevuseks on näiteks membraanide läbilaskvus erinevate mõõtetega partiklite suhtes. Erinevalt mikrofiltratsioonist ei väljendata ultrafiltratsioonil membraani läbilaskepiiri ("cut-off") mitte partiklite läbimõõdu, vaid nende molekulaarmassi põhjal, mis jääb vahemikku  $10^3$  kuni  $2 \times 10^6$  Da. Lisaks membraanist läbi tulnud filtraadile (permeaadile) tekib ultrafiltratsiooni käigus ka niinimetatud kontsentraat (retentaat).

Tahkete osakeste eemaldamiseks ning lahuse rikastamiseks või puhastamiseks keskmise või suure molekulaarmassiga lahustunud ainetest kasutatakse käesolevas leiutises eelistatult asümmeetrilise struktuuriga poorseid membraane.

Käesolevas leiutises kasutatavad membraanid koosnevad eelistatult lahutuvast membraankihist, tänu millele toimub ainete tegelik eraldamine, ning ühest või rohkemast suurema pooride läbimõõduga eraldavat kihti kandvast kaitsekihist. Nii eraldavad- kui kaitsekihid võivad olla valmistatud orgaanilistest või anorgaanilistest polümeeridest, keraamilisest materjalist, metallist või grafiidist. Reaktsioonikeskkonnas ja filtreerimisel kasutatavatel temperatuuridel peavad nimetatud membraankihid olema piisavalt stabiilsed. Tabelis 1 on toodud mõningad näited võimalikest membraanide valmistamisel kasutatavatest materjalidest. Käesolev leiutis ei piirne aga sealtoodud loeteluga.

Käesolevas leiutises kasutatavateks membraanideks võiva olla nii kapillaar- kui lapikmembraanid vastavates membraanmoodulites.

Sõltuvalt kasutatava membraani pooride läbimõõdust *resp.* läbilaskepiirist (molekulaarmassi ühikutes), membraani mehhaanilisest stabiilsusest ja membraani liigist jääb membraani eri pooltele rakendatav rõhkude vahe vahemikku 1 kuni 40 bar. Eelnevalt mainitud suurem rõhkude vahe on ebasoovitav, põhjustades suuremat permeaatvoolu ja membraanifiltri võimalikku ummistumist. Juhul, kui puhastatavat lahust juhitakse filtrile liiga suure rõhuga, võib reguleerimiseks tõsta rõhku membraani filtraadi poolsel küljel.

Filtreerimise puhul kasutatav temperatuur sõltub nii produkti kui membraani stabiilsusest, jäädes ligikaudu vahemikku  $20\text{ °C}$  kuni  $90\text{ °C}$ , eelistatult  $40\text{ °C}$  kuni  $70\text{ °C}$ . Kõrgemad temperatuurid põhjustavad suurema lahuse läbivoolu (permeaatvoolu) membraanist. Seejuures võib kasutada tabelis 2 toodud membraane. Käesolev leiutis ei piirdu siiski selases loetelus toodud materjalidega.

Rakumassi eemaldamine võib käesolevas leiutises soovi korral toimuda ka



kasutades membraanfiltratsiooni eriliiki - diafiltratsiooni.

Diafiltratsioon võib toimuda mittepidevalt. Sellisel juhul liigub D-pantoteen-  
happe mitmevalentsete kationide sooli sisaldav lahus läbi süsteemi, mis koosneb  
pumbast, ühest või enamast membraanmoodulist ja kogujast. Rõhk membraanmoodu-  
lites on reguleeritud nii, et lahus liigub läbi membraanide ja kogujasse koguneb filtraat.  
Seejuures lisatakse süsteemi pidevalt või kindlate ajavahemike tagant vett või vesilahust,  
mis kas ei sisalda üldse eraldatavat produkti või sisaldab teda väiksemas koguses kui  
produkti lahus lisamise alguses. Käesolevas leiutises võib vesilahuseks olla  
mitmevalentsete kationide soolade lahus, kusjuures nimetatud sooladeks võivad olla  
kaltsium- või magneesiumhalogeniidid või nende segu, eelistatult kaltsium- ja/või  
magneesiumkloriid.

Käesolevas leiutises võib diafiltratsioon toimuda ka pidevalt. Sellisel juhul  
koosneb süsteem üksteisega ridamisi ühendatud membraanmoodulitest või membraan-  
moduleid sisaldavatest ridamisi ühendatud pumbasüsteemidest. Membraanmoodulite  
või pumbasüsteemide ees, sees või järel võib toimuda vee või vesilahuse lisamine, mis  
eraldatavat produkti kas üldse ei sisalda või sisaldab seda vähem kui produkti lahus  
lisamise alguses. Ka pideva diafiltratsiooni korral võib kasutatav vesilahus sisaldada  
mitmevalentsete kationide sooli, milleks on näiteks kaltsium- või magneesiumhalo-  
geniidid või nende segud, eelistatult kaltsium- ja/või magneesiumkloriid.

Ultra- või diafiltratsioonil võib käesolevas leiutises kasutada vahetult fermentat-  
siooni järel saadud segu, samuti eelneva töötluse (näiteks tsentrifuugimine, dekantee-  
rimine või muu sarnane) läbi teinud fermentatsioonisegu.

Juhul, kui käesolev leiutis sisaldab etappi, mille käigus eemaldatakse  
fermentatsioonisegust rakumass või väljasadenenud komponendid, võib etapis b)  
kirjeldatud mitmevalentsete kationide soolade lisamine toimuda enne ultra- või  
diafiltratsiooni, ultra- või diafiltratsiooni käigus või pärast ultra- või diafiltratsiooni.  
Käesolevas leiutises kasutatavateks mitmevalentseteks kationideks võivad olla näiteks  
kaltsium- ja/või magneesiumkloriid, -nitraat, -hüdrokxiid, -formiaat, -atsetaat, -propio-  
naat, -glütsinaat ja/või -laktaat. Lisatavate mitmevalentsete kationide nagu näiteks  $\text{Ca}^{2+}$   
kontsentratsioon jääb vahemikku 0,05 - 50 mooli  $\text{Ca}^{2+}$  1 mooli D-pantoteenhappe kohta,  
eelistatult 0,2 - 2 mooli  $\text{Ca}^{2+}$  1 mooli D-pantoteenhappe kohta.

Käesoleva leiutise etapis c) toimub D-pantoteenhappe mitmevalentsete soolade

lahuse puhastamine ja samaaegne rikastamine D-pantoteenhappega nanofiltratsiooni teel. Puhastamise käigus vabanetakse ebasoovitavatest ühevalentsetestioonidest, eelistatult katioonidest nagu näiteks ammoonium-, naatrium- või kaaliumioonidest. Eelkirjeldatud meetod võimaldab ühevalentsete katioonide, eelistatult ammoonium-, 5 kaalium- või naatriumioonide, sisalduse viia kontsentratsioonini mitte üle 5 g/kg (lahus).

Käesolev leiutis hõlmab kõiki kaubandusvõrgus kättesaadavaid nanofiltratsiooni süsteeme. Kasulikud on asümmeetrilise struktuuriga poorsed membraanid. Eelistatult leiavad käesolevas leiutises nanofiltratsioonil kasutamist membraanid, mis koosnevad lahutavast membraankihist, tänu millele toimub ainete tegelik eraldamine, ning ühest või 10 mitmest üksteise peal paiknevast suurema pooride läbimõõduga kaitsekihist, mis kannavad lahutavat kihti. Nii lahutavad- kui kaitsekihid võivad olla valmistatud orgaanilistest polümeeridest, keraamilistest materjalidest, metallist või grafiidist ning nad peavad olema reaktsioonikeskkonnas ja filtreerimisel kasutatavatel temperatuuridel piisavalt stabiilsed. Lahutava kihi jaoks on eelistatud materjalideks polüamiidid, 15 polüimiidid või polüpiperasiinid. Lahutava kihi pind võib olla nii positiivse kui negatiivse laenguga. Anioonse nanofiltratsioonimembraani näiteks võib tuua membraani DESAL 5 DK. Käesolev leiutis ei piirdu siiski nimetatud membraaniga.

Käesolevas leiutises kasutatavateks membraanideks võivad olla nii kapillaar- kui lapikmembraanid vastavates membraanmoodulites.

20 Käesoleva leiutise etapis c) on nanofiltratsiooni käigus kasulik rakendada rõhkude vahet 5 - 100 bar, eelistatult 20 - 80 bar ning eriti eelistatult 40 - 70 bar.

Nanofiltratsioonil kasutatav temperatuur võiks jääda vahemikku 20 °C kuni 80 °C, eelistatult 30 °C kuni 60 °C. Lisaks võib nanofiltratsiooni protseduur olla pidev või mittepidev.

25 Ühes käesoleva leiutise eelistatud variandis lisatakse fermentatsioonilahusele enne nanofiltratsiooni etappe mitmevalentsete katioonide sooli. Nimetatud sooli võib lisada nii tahkel kujul kui vesilahusena. Käesolevas leiutises kasutatakse mitmevalentsete katioonidena kaltsium- ja/või magneesiumkloriidi, -nitraati, -hüdroksiidi, -formiaati, -atsetaati, -propionaati, -glütsinaati ja/või laktaati. Lisatava mitmevalentse 30 katiooni nagu  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioon jääb vahemikku 0,05 - 50 mooli  $\text{Ca}^{2+}$  1 mooli D-pantoteenhappe kohta, eelistatult 0,2 - 2 mooli  $\text{Ca}^{2+}$  1 mooli D-pantoteenhappe kohta (arvestuse aluseks ainete kogused moolides pärast soolade lisamist).

Käesolev leiutis erineb selle poolest, et mitmevalentsete katioonide sooli sisaldava lahuse lisamine tahkel kujul või vesilahusena toimub kas etapis a) kirjeldatud fermentatsiooniprotsessi jooksul, eelistatult selle protsessi lõpus või pärast fermentatsiooniprotsessi. Nimetatud soolade lahuse lisamine võib toimuda ka rakumassi eraldamise käigus või pärast seda.

Samuti võib käesolevas leiutises osutada kasulikuks mitmevalentsete katioonide soolade lisamine nanofiltratsiooni ajal. Mitmevalentsete katioonide sooli sisaldava lahuse lisamine võib toimuda ka pidevalt.

On võimalik, et ühe või mitme nanofiltratsioonile eelneva etapi käigus tekivad erineva produkti kontsentratsiooniga lahused. Sellisel juhul võib nimetatud lahuste nanofiltratsioon toimuda nii, et filtratsiooni käigus lisatakse filtreeritavale lahusele teisi järjest suurema produkti kontsentratsiooniga lahuseid.

Eelnevalt kirjeldatud nanofiltratsioonimeetodi rakendamisel rikastub filtratsioonil tekkinud kontsentraat eelkõige pantoteenhappe mitmevalentsete sooladega. Tänu anioonse nanofiltratsioonimembraani kasutamisele rikastub membraani läbinud filtraat ühevalentsete katioonidega. Ühevalentsete katioonide, eelistatult ammoonium-, kaalium- ja/või naatriumioonide sisaldus kontsentraadis (retentaadis) on seejuures võimalik viia kontsentratsioonini mitte üle 5 g/kg (lahus).

Nanofiltratsiooni käigus tekkinud filtraati (permeaati) või osa sellest võib uuesti lisada käesoleva leiutise etapis a) kirjeldatud fermentatsioonisegusse, kusjuures lisamine võib toimuda pidevalt või mittepidevalt. Eelnevalt kirjeldatud nanofiltratsioonile eelnevad või järgnevad lisaetapid võimaldavad kontsentreerida D-pantoteenhapet tema mitmevalentsete soolade kujul.

Käesolevas leiutises kasutatava nanofiltratsiooni meetodi lisaeeliseks on asjaolu, et monovalentsete katioonide sisalduse vähenemisega kontsentraadis kaasneb samaaegselt kontsentraadi mahu vähenemine. D-pantoteenhapet sisaldavate lahuste puhastamiseks rakendatav nanofiltratsioon teeb lisaks võimalikuks D-pantoteenhappe valmistamiseks vajalikuioonvahetuse ja kontsentreerimise.

See lihtsustab ning tõhustab järgnevaid valmistamisetappe. Näiteks aitab nanofiltratsiooni käigus toimuv D-pantoteenhappe lahuse kontsentreerimine oluliselt vähendada energiakulu produkti hilisemal kuivatamisel.

Ühes käesoleva leiutise eelistatud rakenduses eemaldatakse rakumassi

fermentatsioonilahusest tsentrifuugimise ja/või dekanteerimise ja/või ultrafiltratsiooni teel. Seejärel lisatakse fermentatsioonilahusele 0,05 kuni 50 mooli  $\text{Ca}^{2+}$ -ioone 1 mooli pantoteenhappe kohta, eelistatult 0,2 - 2 mooli  $\text{Ca}^{2+}$ -ioone 1 mooli pantoteenhappe kohta, kusjuures lisatavas lahjas vesilahuses on  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioon 0,01 - 10 mol/l.

5 Saadud lahus juhitakse nanofiltratsiooni moodulisse. Rõhkude vahe nanofiltratsiooni membraani kummalgi poolel jääb ligikaudu vahemikku 5 - 100 bar, eelistatult 20 - 80 bar ning eriti eelistatult 40 - 70 bar. Nanofiltratsiooni eel või ajal võib membraanil olevale filtreeritavale lahusele lisada  $\text{Ca}^{2+}$ -ioone sisaldavat vesilahust. Filtratsiooni järel membraanile jääva kontsentraadi ruumala on 30 - 200% algse lahuse ruumalast. Lisaks

10 eemaldatakse nanofiltratsiooni käigus ligikaudu 5 - 90%, eelistatult aga 30 - 80% alglahuses sisaldunud monovalentsetest katioonidest.

Eelistatult kaltsium-D-pantotenaati, magneesium-D-pantotenaati või nende segu sisaldav kontsentraat kuivatatakse järgnevalt ja/või viiakse soolad neile vastava täpse molekulkalauni. Kaltsium- ja/või magneesiumpantotenaati sisaldava lahuse või suspensiooni kuivatamine ja/või täpse molekulkalauni viimine toimub vastavuses hästituntud

15 meetoditele nagu kuivatamine gaasijoasse pihustamisega, granuleerimine pihustamisega, keevkihtkuivatamine ja keevkihtgranulatsioon, trummelkuivatamine või kiirkuivatamine tsentrifuugimisega (*Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6. väljaande elektrooniline versioon, 1999, peatükk "tahkete materjalide kuivatamine"). Kuivatisse

20 juhitava gaasi temperatuur konvektsioonkuivatamise korral jääb vahemikku 100 °C - 280 °C, eelistatult 120 °C - 210 °C. Väljumistemperatuur kuivatist jääb vahemikku 50 °C - 180 °C, eelistatult 60 °C - 150 °C. Saavutamaks aineosakeste suuruse soovitud jaotust, millelega on otseselt seotud saadud aine omadused, võib väiksemaid partikleid kas eemaldada või lisada. Lisaks võib suuremaid ainetükke peenemaks jahvatada ning

25 hiljem lisada ülejäänud materjalile.

Käesolevas leiutises kirjeldatud meetodite eeliseks on asjaolu, et üheaegselt ebasoovitavate katioonide efektiivse ja peaaegu täieliku eemaldamisega lahusest toimub ka lahuse ruumala vähenemine, mis oluliselt lihtsustab ja tõhustab järgnevaid etappe, eelkõige produkti kuivatamist ja täpse molekulkalauni viimist. Lisaks ei toimu seejuures

30 produkti lagunemist või toimub see äärmiselt vähesel määral, samal ajal aga on produkti saagis kõrge. D-pantoteenhappe saagist mitmevalentsete, eelistatult kahevalentsete katioonide nagu kaltsium või magneesium, sooladena aitab tõsta ka mitmevalentsete

kationide soolade lahuste lisamine fermentatsiooniprotsessi ajal või selle lõpus, ultrafiltratsiooni või diafiltratsiooni ajal või lõpus või nanofiltratsiooni ajal, samuti filtraadi tagasijuhtimine fermentatsioonilahusesse.

Käesolevale leiutisele tuleb kasuks asjaolu, et eelnevalt kirjeldatud valmistamise  
5 etappides on vähendatud töömahukate puhastamisprotseduuride arvu ning mis eriti oluline - ei kasutata orgaanilisi lahusteid. Tulemusena saadakse aga bioloogiliselt kasulike omadustega produkt. Samuti on käesolevas leiutises oluliselt vähenenud tekkivate heitmete kogus. See aitab säästa ressursse töömahukate puhastus- ja jäätmetöötlusrajatiste arvelt. Käesolevas leiutises esitatud meetod erineb senikirjeldatud  
10 meetoditest ka selle poolest, et ta on nendega võrreldes lihtsam, reprodutseeritavam, vähem aeganõudvam, tunduvalt odavam ja seetõttu majanduslikult tasuvam.

See aga ei välista võimalust varieerida käesolevas leiutises kasutatavaid meetodeid. Eelnevalt loetletud tootmisetappe võib täiendada edasiste etappidega, milles esinev meetod on eraldivõetuna erialaselt kogenud asjatundja jaoks hästi teada. Siia  
15 kuuluvad kõik mõeldavad täiendavate tootmismeetodite kombinatsioonid lisaks senikirjeldatutele.

Näiteks võib fermentatsiooni käigus tekkinud lahustest tappa mikroorganismid kuumutamise või teiste meetodite abil nagu pastöriseerimine või steriilfiltratsioon.

Samuti võib käesoleva leiutise ühes võimalikest rakendustest nanofiltratsioonil  
20 saadud kontsentraadi kuivatamise ja/või täpse molekulaaluni viimise etapile eelneva vähemalt üks ja/või mitu järjestikust etappi ja/või nende kombinatsiooni, milleks võib olla mikroobirakkude lüüs ja/või surmamine ja/või biomassi eemaldamine fermentatsioonilahusest ja/või muude keemiliste ühendite lisamine lahusele ja/või fermentatsioonilahuse kuivatamine, eelistatult lahustiks oleva vee eemaldamise teel.

25 Ka on mõeldav meetod, mille puhul biomassi lüüs ja/või surmamine leiab aset juba fermentatsioonilahuses või alles pärast biomassi eemaldamist fermentatsioonilahusest. See võib toimuda näiteks kuumutamise teel, sellisel juhul eelistatult 80 - 200 °C juures, ja/või happega töötlemise teel, kusjuures eelistatud on töötlus väävel- või soolhappega, ja/või kasutades ensümaatilist töötlust, eelistatult töötlust lüsotsüümiga.

30 Mõeldav on ka saadud rakumassi eemaldamine vahetult nanofiltratsiooni teel, s.t samaaegselt ühevalentsete ionide asendamisega mitmevalentsetega.

Nanofiltratsioonil saadud lahust võib enne kuivatamist ja/või täpse molekulaaluni viimist kontsentreerida sobiva aurutiga, näiteks rotatsioonaurutiga, kelmeaurutiga või lüofilisaatoriga. Nimetatud auruteid toodavad näiteks firmad GIG (4800 Attnang Puchheim, Austria), GEA Canzler (52303 Düren, Saksamaa Liitvabariik), Diessel  
5 (31103 Hildesheim, Saksamaa Liitvabariik) ja Pitton (35274 Kirchhain, Saksamaa Liitvabariik).

Lõpp-produkti värvusomaduste parandamiseks filtreerimise teel lisatakse eelnevate etappide tulemusena saadud lahusele või suspensioonile aktiivsütt ning saadud suspensiooni filtreeritakse. Samuti võib fermentatsioonil tekkinud lahuseid voolutada  
10 läbi aktiivsütt sisaldava väikese kolonni. Vajalikud aktiivsöe kogused jäävad mõne kaaluprotsendini fermentatsioonilahuse kogukaalust ning aktiivsöega puhastamise tehnikad on asjatundajatele hästi teada.

Nimetatud filtreerimisetappide kergendamiseks võib lahustele enne filtreerimist lisada standardset sadestamist parandavat lahust ehk helvestit (näit. Sedipur CF 902 või  
15 Sedipur 930, tootja BASF AG, Ludwigshafen).

Käesolevas leiutises võib osutada kasulikuks fermentatsioonisegu steriliseerimine kuumutamise teel ning järgnev rakumassi eemaldamine tsentrifuugimise, filtreerimise, ultrafiltreerimise või dekanteerimise teel. Peale standardse helvesti lisamist koguses 50 - 1000 mg/kg, eelistatult 100 - 200 mg/kg fermentatsioonisegu kohta, filtreeritakse segu lühiajaliselt üle aktiivsöe ja liiva, mille järel saadakse biomassivaba kõrge D-pantoteenhappe sisaldusega lahus. Saadud lahust töödeldakse järgnevalt nanofiltratsiooni  
20 teel.

Nanofiltratsioonil saadud lahuse kuivatamine võib toimuda näiteks pihustamise teel. Pihustamiseks võib kasutada nii kaasavoolu, vastuvoolu- või segavoolu tehnikat.  
25 Kasutada võib kõiki tuntud pihusteid, iseäranis tsentrifugaalpihusteid (tsentrifugaalseibe), üksik- või kaksikdüüse. Eelistatavateks kuivatustemperatuurideks on siseneva gaasijoa puhul 150 °C - 250 °C ja väljumise puhul 70 °C -130 °C. Kuivatamine võib aga toimuda ka kõrgematel või madalamatel temperatuuridel. Lõpp-produktis sisalduva jääkniiskuse edasiseks vähendamiseks võib produkti kuivatada gaaskuivatis.

30 Kuivatamine pihustamise teel võib toimuda ka FSD- või SBD-kuivatil (FSD: Fluidized Spray Dryer; SBD - Spray Bed Dryer, tootjad Niro (Kopenhaagen, Taani) ja

AVP-anhydro (Kopenhaagen, Taani)), mis kujutab endast kombinatsiooni pihustamise teel ja keevkihtkuivatusest.

Pihustamisega kuivatamise korral võib lahusele lisada pihustusvahendit. See aitab vähendada kuivati seintele kantava kattedihi paksust ning parandada pihustamisprotsessi ennast, seda eriti peeneteraliste pulbrite korral. Pihustusvahenditena on eriti sobivad silikaadid, stearaadid, fosfaadid ning maisitärklis.

Põhimõtteliselt võib kuivatamine toimuda ka pihustamise teel keevkihile, seda nii pidevalt kui mittepidevalt. Lahuse või suspensiooni pihustamine võib toimuda nii altpoolt (Bottomspray), ülevalt poolt (Topspray) kui küljepealt (Sidespray).

Lisaks puudutab käesolev leiutis loomasööda lisandina kasutatava segu valmistamist, kusjuures valmistamisprotseduuri käigus:

- a) kasutatakse vähemalt ühte sellist D-pantoteenhapet produtseerivat organismi, milles on dereguleeritud pantoteenhappe (pan)- ja/või isoleutsiini-valiini (ilv) biosünteesirada ning mis toodab fermentatsiooni käigus pantoteenhappe soolasid vähemalt 2 g/l, kusjuures kasvumeediumisse on lisatud 0 - 20 g/l, eelistatult 0 g/l vaba  $\beta$ -alaniini ja/või mõnda  $\beta$ -alaniini soola,
- b) saadud D-pantoteenhapet sisaldavale lahusele lisatakse mitmevalentsete katioonide sooli, mille tulemusena tekivad D-pantoteenhappe mitmevalentsed soolad,
- c) D-pantoteenhappe mitmevalentseid sooli sisaldavat lahust nanofiltreeritakse, kusjuures filtrile jääv kontsentraat rikastub nimetatud sooladega ning
- d) nimetatud D-pantoteenhappe sooli sisaldava nanofiltratsiooni tulemusel tekkinud kontsentraat kuivatatakse ja/või viiakse nimetatud soolad neile vastava täpse molekulkaaluni.

Käesoleva leiutise üks variant hõlmab segu, mis erineb selle poolest, et tema valmistamise käigus eelneb nanofiltratsiooni etapile c) fermentatsioonilahuse puhastamine rakumassist või välja sadenenud komponentidest, kusjuures puhastamine toimub eelistatult membraanfiltratsiooni, eelistatumalt ultrafiltratsiooni ning iseäranis eelistatult diafiltratsiooni teel. Samuti puudutab käesolev leiutis koostist, mis erineb selle poolest, et tema valmistamise käigus - rakumassi või välja sadenenud komponentide eemaldamise ajal või pärast seda - lisatakse lahusele mitmevalentsete katioonide sooli

(tahkel kujul või lahusena). Nimetatud sooli võib käesolevas leiutises lahusele lisada ka nanofiltratsiooni ajal.

Käesolev leiutis erineb senini esitatud leiutistest lisaks selle poolest, et D-pantoteenhappe soolade sisaldus segus ulatub vähemalt 1 - 100%-ni (kaaluliselt), eelistatult vähemalt 20 - 100%-ni ning iseäranis eelistatult 50 - 100%-ni. Käesoleva leiutise objektiks on segu, mis sisaldab D-pantoteenhapet kahevalentsete metallide sooladena, eelistatult kaltsium- ja/või magneesiumpantotenaadi kujul. Käesolevas leiutises on eelistatud segu, mis erineb selle poolest, et D-pantoteenhappe hulk ühevalentsete metallide sooladena ei ületa kogust 5 g/kg (segu).

Käesolevas leiutises esitatud meetod võimaldab toota D-pantoteenhapet tema kaltsium- ja/või magneesiumsoolade kujul, kusjuures nimetatud soolad täidavad loomasööda lisanditele esitatavaid nõudeid. Nendeks nõueteks on näiteks suhteliselt kõrge D-pantoteenhappe sisaldus produktis ning sobivus sihtorganismi jaoks. Samuti peab leiutises käsitletud produkt toimima sihtorganismis vitamiinina.

Käesolevas leiutises välja pakutud valmistamise meetodi selgitavad järgnevad näited. Käesoleva leiutise rakendused ei piirdu siiski järgnevalt toodud näidetega.

#### Näide 1:

14 l laborifermeterisse, mis oli varustatud segajaga ning võimaldas fermentatsioonisegu õhutamist, lisati järgmise koostisega vedel fermetatsioonilahus:

Komponent	Kontsentratsioon (g/l)
Pärmiekstrakt	5
Sojajahu	40
Naatriumglutamaat x H <sub>2</sub> O	5
Ammooniumsulfaat	8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	6,15
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	12

Peale saadud lahuse steriliseerimist lisati sinna järgmised steriliseeritud kasvukeskkonna komponendid:



Komponent	Kontsentratsioon (g/l)
Glükoos x H <sub>2</sub> O	20
Kaltsiumsulfaat	0,1
Magneesiumsulfaat	1
Naatriumtsitraat	1
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,01
Mikroelementide lahus	1 ml

Mikroelementide lahuse koostis oli järgnev:

0,15 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 2,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,7 g CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0,25 g CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, 1,6 g MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O, 0,3 g ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O - kõik lahustatud 1 l vees. Mikroelementide lahus oli enne lisamist filtreerimise teel steriliseeritud. Fermentatsioonilahuse algne kogus fermentatsioonireaktoris oli 5 l. Kõigi ülaltoodud ühendite sisaldused on arvestatud selle ruumala kohta.

Saadud fermentatsioonilahust inokuleeriti 100 ml *Bacillus subtilise* tüve PA 668 inokulumiga (OD = 10) ning alustati fermenteerimist 43 °C juures, kasvukeskkonda intensiivselt segades. Fermentatsioonisegu õhuga läbivoolutamise kiirus oli 12 l/min. Nimetatud tüvi on kirjeldatud Ameerika Ühendriikide patenditaotluses nr 60/262995.

47 tunni jooksul lisati fermentatsioonisegusse koguruumalas 2,1 l steriliseeritud vesilahust järgneva koostisega:

Komponent	Kontsentratsioon (g/l)
Glükoos	800
Kaltsiumkloriid	0,6
Naatriumglutamaat x H <sub>2</sub> O	5
Naatriumtsitraat	2
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,2
Mikroelementide lahus	6 ml

Fermentatsioonisegu pH väärtus hoiti protsessi käigus 7,2 juures vastavalt 25% ammoniaagi- või 20% fosforhappe lahuse lisamisega. Ammoniaak oli fermentatsioonil samaaegselt ka lämmastikuallikaks. Fermentatsioonikeskkonna segamise kiirus hoiti selline, et lahustunud hapniku kogus püsis 30% juures vastavast küllastavast kogusest

antud tingimustel. Peale süsinikuallika lisamise katkestamist jätkati fermentatsiooniprotsessiga kuni lahustunud hapniku kogus ( $pO_2$ ) jõudis 95%-ni vastavast küllastavast väärtusest. 48 tunnise fermentatsiooni järel oli D-pantoteenhappe kontsentratsioon segus 22,8 g/l.

- 5 Analoogselt on võimalik selliste fermentatsioonisegude valmistamine, kus pantoteenhappe tiiter ilma  $\beta$ -alaniini lisamiseta ulatub üle 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ja > 90 g/l.

#### Näide 2:

- 10 7000 ml fermentatsioonisegu, mis oli saadud analoogselt näitele 1, ultrasentrifuugimiseks kasutati keraamilisest materjalist ühekanalilist torumoodulit (tootja Atech, Gladbeck, Saksamaa Liitvabariik). Kasutatud membraanides oli pooride läbimõõt ühel juhul 10 nm (20 kD), teisel juhul 50 nm.

- 15 Temperatuur ultrafiltratsioonil oli 40 °C, ülevoolukiirus 4 m/s ja rõhkude vahe membraanil ( $TMP = [p(\text{toide}) + p(\text{konsentraat})] / 2 - p(\text{permeaat})$ ) 1 bar, juhul kui seda pole spetsifitseeritud teisiti.

Joonisel fig.1 on esitatud membraani läbiva voolu kiiruse (permeaatvoolu) sõltuvus kontsentreerimistegurist MK ( $MK(t) = m_{\text{sisend}} / m_{\text{retentaat}}(t)$ ).

- 20 Nimetatud jooniselt on näha, et väiksema pooride läbimõõduga või läbilaskepiiriga ("cut-off" 20 kD) membraanide puhul on voolukiirused oluliselt suuremad kui suurema pooride läbimõõduga ("cut-off" 50 kD) membraanide korral.

#### Näide 3:

- 25 7000 ml fermentatsioonisegu, mis oli saadud analoogselt näitele 1, ultrafiltreeriti analoogselt näitele 2, kusjuures filtratsioonil kasutatud membraani pooride läbimõõt vastas läbilaskepiirile 20 kD.

Jooniselt fig. 2 on näha, et fermentatsioonisegu eelnev tsentrifuugimine tõstab võrreldes näitega 2 hilisema kontsentreerimisetapi efektiivsust tunduvalt.

- 30 Näide 4:

1000 ml kaltsiumpantotenaati sisaldavat vesilahust (tabel 3, veerg "retentaadi algkogus") kontsentreeriti magnetsegamisega kontsentreerimisrakus, mille maksimaalne

mahtuvus oli 1,5 l. Rõhk kontsentreermisrakus tekitati lämmastikuga ning membraani ühtlaseks katmiseks lahusega kasutati kontsentreermisrakku sisseehitatud magnetsegajat.

Membraanina kasutati firma Osmonics GmbH (Saksamaa Liitvabariik, Moers) nanofiltratsioonimembraani DESAL 5 DK.

- 5 Eelmainitud lahuse filtreerimise ajal ning enne ja pärast filtreerimist kontrolliti membraani terviklikkust, mõõtes membraani retentsioonivõimet  $MgSO_4$  lahuse (2000 ppm. kaaluliselt) suhtes.

Membraani retentsioonivõime  $R_i$  on arvuliselt iseloomustatud tabeli 3 kahes kõige parempoolsemas veerus. Retentsioonivõime on seejuures defineeritud järgnevalt:

10  $R_i = 1 - C_{i, \text{permeaat}}/C_{i, \text{retentaat}}$  ; kus  $R_i$  on membraani retentsioonivõime  $i$ -nda komponendi suhtes,  $C_{i, \text{permeaat}}$   $i$ -nda komponendi kontsentratsioon permeaadis ning  $C_{i, \text{retentaat}}$   $i$ -nda komponendi kontsentratsioon retentaadis.

Mingi komponendi kontsentratsioonide all mõeldakse siin kindlal ajahetkel esinevaid hetkelisi kontsentratsioone, mitte aga aine filtratsioonijärgset kontsentratsiooni fraktsioonides. Membraani retentsioonivõime  $R_i$  ei sõltu ideaaljuhul lahuse kontsent-

15 ratsioonist ning tabelites 3, 4 ja 5 esitatud retentsioonivõimete arvutamisel lähtuti sellest eeldusest.

Tabelis 3 esitatud andmetest on näha, et kasutatud membraani(de) retentsioonivõime  $Ca^{2+}$  ja pantoteenhape suhtes oli vastavalt 84% ja 99%, s.t nimetatud ained jäävad

20 peaaegu täielikult retentaati.

#### Näide 5:

Na-pantotenaadi vesilahuse (0,2 mol/l) töötlemise käigus kontsentreeriti nimetatud lahust nanofiltratsiooni teel analoogselt näitele 4. Tabelist 4 on näha, et

25 membraani retentsioonivõime pantoteenhappe suhtes oli ligikaudu 80%.

#### Näide 6:

Tabelis 5 on kokkuvõtlikult esitatud  $NaCl/CaCl_2$  ekvimolaarse lahuse kontsent-

reerimise tulemused. Tingimused kontsentreerimisel olid analoogsed näitele 4. Siinkohal

30 peab märkima, et membraani retentsioonivõime  $Ca^{2+}$  suhtes, vastavalt 41% ja 42%, on suhteliselt madal võrreldes kõrge retentsioonivõimega, mida antud membraan omab  $Ca^{2+}$  suhtes pantoteenhappe soola koosseisus.

## Tabelite ja jooniste seletus:

- 5 Joonis fig. 1: membraani läbiva voolu (permeaatvoolu) sõltuvus ultrafiltreeritava fermentatsioonisegu kontsentreerituse astmest (kontsentreerimistegur MK) 20 kD läbilaskepiiriga (pooi läbimõõt 50 nm) membraanide korral.
- 10 Joonis fig. 2: membraani läbiva voolu (permeaatvoolu) sõltuvus ultrafiltreeritava, eelnevalt tseentrifuugitud fermentatsioonilahuse kontsentreerituse astmest (kontsentreerimistegur MK) 20 kD läbilaskepiiriga membraanide korral.
- Tabel 1: loetelu rakumassi või lahusest välja sadenenud komponentide eraldamiseks kasutatavatest asümmeetrilise struktuuriga membraanidest.
- 15 Tabel 2: loetelu rakumassi või lahusest välja sadenenud komponentide eraldamiseks kasutatavatest membraanidest ja nende membraanide omadustest.
- 20 Tabel 3: nanofiltratsiooni tulemusena saadud lahuste analüüs. Eraldi on välja toodud membraani retentsioonivõime kaltsiumioonide ja pantoteenhappe suhtes, kusjuures filtreeritav lahus sisaldas algselt 0,1 mol/kg kaltsium-pantotenaati ja 0,2 mol/kg NaCl.
- 25 Tabel 4: nanofiltratsiooni tulemusena saadud lahuste analüüs. Eraldi on välja toodud membraani retentsioonivõime kaltsiumioonide ja pantoteenhappe suhtes, kusjuures filtreeritav lahus sisaldas algselt 0,2 mol/l naatrium-pantotenaati ja 0,1 mol/l  $\text{CaCl}_2$ .
- Tabel 5: nanofiltratsiooni tulemusena saadud lahuste analüüs. Eraldi on välja toodud membraani retentsioonivõime kaltsiumioonide suhtes, kusjuures filtreeritav lahus sisaldas algselt ekvimolaarses koguses NaCl ka  $\text{CaCl}_2$ .

## PATENDINÕUDLUS

1. Meetod D-pantoteenhappe ja/või tema soolade saamiseks, mis **erineb** selle poolest, et:
  - 5 a) kasutatakse vähemalt ühte sellist pantoteenhapet tootvat mikroorganismi, milles on dereguleeritud pantoteenhappe (pan)- ja/või isoleutsiini-valiini (ilv) biosünteesirada ning mis fermentatsioonikeskkonnas kasvades toodab vähemalt 2 g/l D-pantoteenhapet, kusjuures kasvukeskkonda lisatakse 0 - 20 g/l vaba  $\beta$ -alaniini ja/või  $\beta$ -alaniini sooli,
  - 10 b) saadud D-pantoteenhapet sisaldavale lahusele lisatakse mitmevalentsete kationide sooli, mille tulemusena tekivad D-pantoteenhappe mitmevalentsed soolad,
  - c) D-pantoteenhappe mitmevalentseid sooli sisaldavat lahust nanofiltreeritakse, kusjuures filtrile jääv kontsentraat rikastub nimetatud sooladega ning
  - 15 d) nimetatud D-pantoteenhappe sooli sisaldav nanofiltratsiooni tulemusel tekkinud kontsentraat kuivatatakse ja/või viiakse nimetatud soolad neile vastava täpse molekulaaluni.
2. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis **erineb** selle poolest, et kasvukeskkonda  
20 ei lisata ei  $\beta$ -alaniini ega/või  $\beta$ -alaniini sooli.
3. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1 või 2, mis **erineb** selle poolest, et D-pantoteenhapet produtseeriva organismina kasutatakse bakterit, seent või pärmi.
- 25 4. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 3, mis **erineb** selle poolest, et mikroorganismina kasutatav bakter kuulub batsilliformsete bakterite perekonda.
5. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 4, mis **erineb** selle poolest, et kasutatavaks bakteriks on mõni *Bacilluse* sugukonna bakter, eelistatult *B.subtilis*,  
30 *B.licheniformis* või *B.amyloliquefaciens*

6. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 5, mis **erineb** selle poolest, et etapis a) tekkiva D-pantoteenhappe ja/või tema soolade kogus kasvukeskkonnas on vähemalt 10 g/l, eelistatult vähemalt 20 g/l, veel eelistatavamalt vähemalt 40 g/l ning iseäranis eelistatult vähemalt 60 g/l.
- 5
7. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 6, mis **erineb** selle poolest, et etapis c) toimuvale nanofiltratsioonile eelneb rakumassi või lahusest välja sadenenud komponentide eemaldamine.
- 10
8. Meetod vastavalt nõudluspunktile 7, mis **erineb** selle poolest, et rakumassi või välja sadenenud komponentide eemaldamine lahusest toimub dekanteerimise või membraanfiltratsiooni, eelistatult ultrafiltratsiooni teel.
- 15
9. Meetod vastavalt nõudluspunktile 7 või 8, mis **erineb** selle poolest, et kasutatavaks membraanfiltratsiooni tehnikaks on diafiltratsioon.
- 20
10. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 9, mis **erineb** selle poolest, et mitmevalentsete kationide soolade lisamine fermentatsioonisegusse, kas tahkel kujul või lahuseks, toimub kas etapis a) oleva fermentatsiooniprotsessi ajal, enne või pärast fermentatsiooniprotsessi või D-pantoteenhapet sisaldava lahuse membraanfiltratsiooni ajal või pärast seda.
- 25
11. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 10, mis **erineb** selle poolest, et mitmevalentsete kationide soolade lisamine (tahkel kujul või lahuseks) toimub nanofiltratsioonietapi käigus.
12. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 11, mis **erineb** selle poolest, et mitmevalentsete kationide sooli sisaldava lahuse lisamine toimub pidevalt.
- 30
13. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 12, mis **erineb** selle poolest, et lisatavateks mitmevalentsete kationide sooladeks on kaltsium- ja/või

magneesiumkloriid, -nitraat, -hüdroksiid, -formiaat, -atsetaat, -propionaat, -glütsinaat ja/või -laktaat.

- 5 14. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 13, mis **erineb** selle poolest, et 1 mooli D-pantoteenhappe kohta tuleb lisatavat  $\text{Ca}^{2+}$  iooni 0,05 - 50 mooli, eelistatult 0,2 - 2 mooli.
- 10 15. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 14, mis **erineb** selle poolest, et nanofiltratsioonietapis c) jääb membraanile rakendatav rõhkude vahe vahemikku 5 - 100 bar, eelistatult 20 - 80 bar ning iseäranis eelistatult 40 - 70 bar.
- 15 16. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 15, mis **erineb** selle poolest, et etapis c) mainitud nanofiltratsiooni järel ei ületa ühevalentsete kationide, eelistatult ammonium-, kaalium- ja/või naatriumioonide kogus lahuses 5 g/kg (lahus).
- 20 17. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 16, mis **erineb** selle poolest, et etapi c) käigus tekkiv permeaat või osa sellest juhitakse tagasi algsesse fermentatsioonisegusse.
- 25 18. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 17, mis **erineb** selle poolest, et permeaadi või osa sellest tagasijuhtimine algsesse fermentatsioonisegusse toimub pidevalt.
- 30 19. Meetod vastavalt ühele nõudluspunktile 1 kuni 18, mis **erineb** selle poolest, et etapis c) tekkivaks retentaadiks on D-pantoteenhappe mitmevalentseid sooli sisaldav suspensioon.
20. Loomasööda lisandina kasutatav koostis, mis **erineb** selle poolest, et tema valmistamise käigus kasutatakse vähemalt ühte sellist D-pantoteenhapet tootvat organismi, milles on:

- a) deguleeritud pantoteenhappe-(pan) ja/või isoleutsiini-valiini-(ilv) biosünteesirada ning mis fermentatsioonikeskkonnas kasvatades toodab vähemalt 2 g/l D-pantoteenhapet, kusjuures kasvukeskkonda lisatakse vaba  $\beta$ -alaniini ja/või  $\beta$ -alaniini sooli koguses 0 - 20 g/l, eelistatult 0 g/l.
- 5 b) saadud D-pantoteenhapet sisaldavale lahusele lisatakse mitmevalentsete kationide sooli, mille tulemusena tekivad D-pantoteenhappe mitmevalentsed soolad,
- c) D-pantoteenhappe mitmevalentseid sooli sisaldavat lahust nanofiltreeritakse, kusjuures filtrile jääv kontsentratsioon rikastub nimetatud sooladega ning
- 10 d) nimetatud D-pantoteenhappe sooli sisaldav nanofiltratsiooni tulemusel tekkinud kontsentratsioon kuivatatakse ja/või viiakse nimetatud soolad neile vastava täpse molekulaaralusele.
21. Koostis vastavalt nõudluspunktile 20, mis **erineb** selle poolest, et tema tootmise käigus toimuvale nanofiltratsioonile etapis c) eelneb rakumassi või lahusest välja sadenenud komponentide eemaldamine eelistatult membraanfiltratsiooni, eelistatumalt ultrafiltratsiooni ning eriti eelistatult diafiltratsiooni teel.
- 15
22. Koostis vastavalt nõudluspunktile 20 või 21, mis **erineb** selle poolest, et rakumassi või välja sadenenud komponentide eemaldamise ajal või pärast seda lisatakse fermentatsioonil saadud segule mitmevalentsete kationide sooli.
- 20
23. Koostis vastavalt ühele nõudluspunktile 20 kuni 22, mis **erineb** selle poolest, et mitmevalentsete kationide soolade lisamine toimub nanofiltratsiooni ajal või enne seda.
- 25
24. Koostis vastavalt ühele nõudluspunktile 20 kuni 23, mis **erineb** selle poolest, et D-pantoteenhappe esineb nimetatud segus oma kahevalentsete kationide sooladena, eelistatult kaltsium- ja/või magneesium-D-pantotenaadi kujul.
- 30



25. Koostis vastavalt ühele nõudluspunktile 20 kuni 24, mis erineb selle poolest, et D-pantoteenhappe soolade sisaldus nimetatud segus jääb vahemikku 1 - 100% (kaaluliselt), eelistatult 20 - 100% ning eriti eelistatult 50%.
- 5 26. Koostis vastavalt ühele nõudluspunktile 20 kuni 25, mis erineb selle poolest, et D-pantoteenhappe ühevalentsete soolade kontsentratsioon segus ei ületa 5 g/kg (lahus).

Fig. 1:

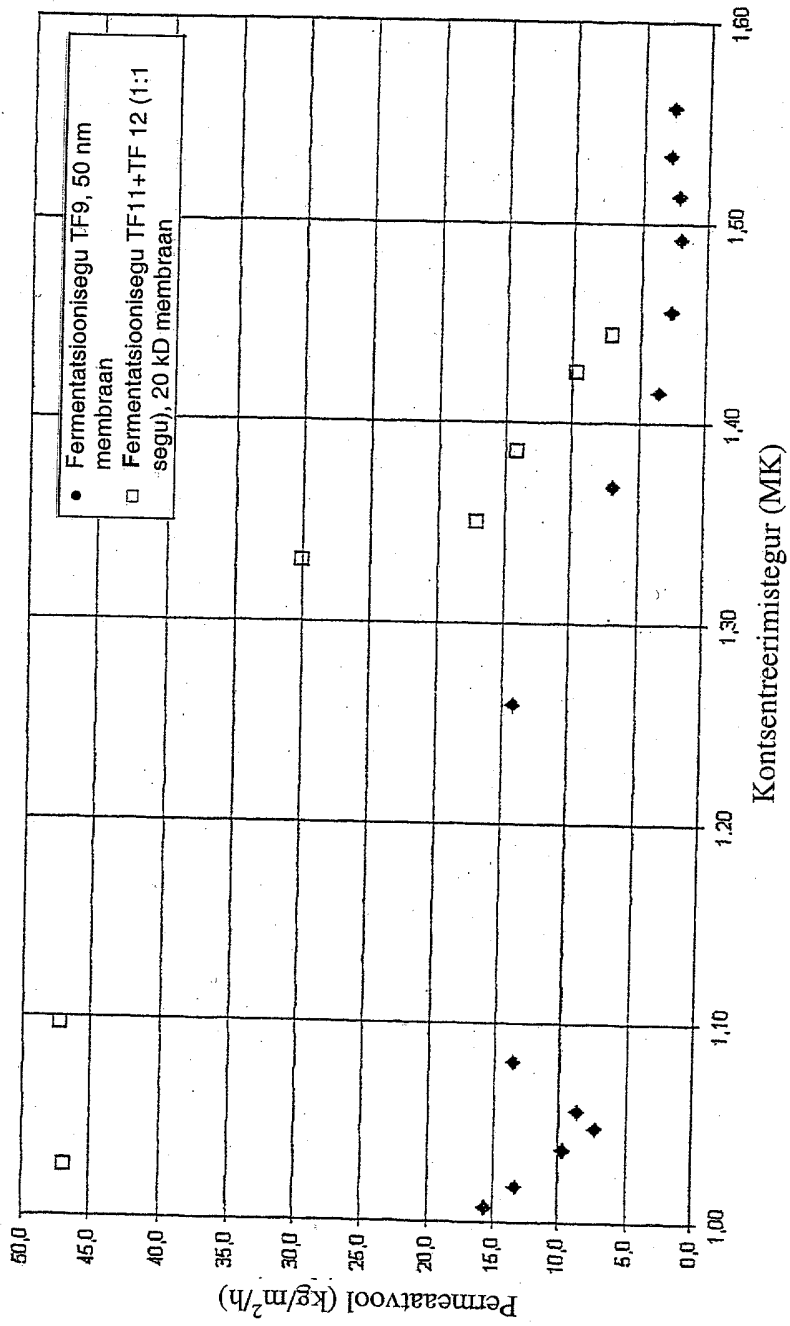


Fig. 2:

2/7

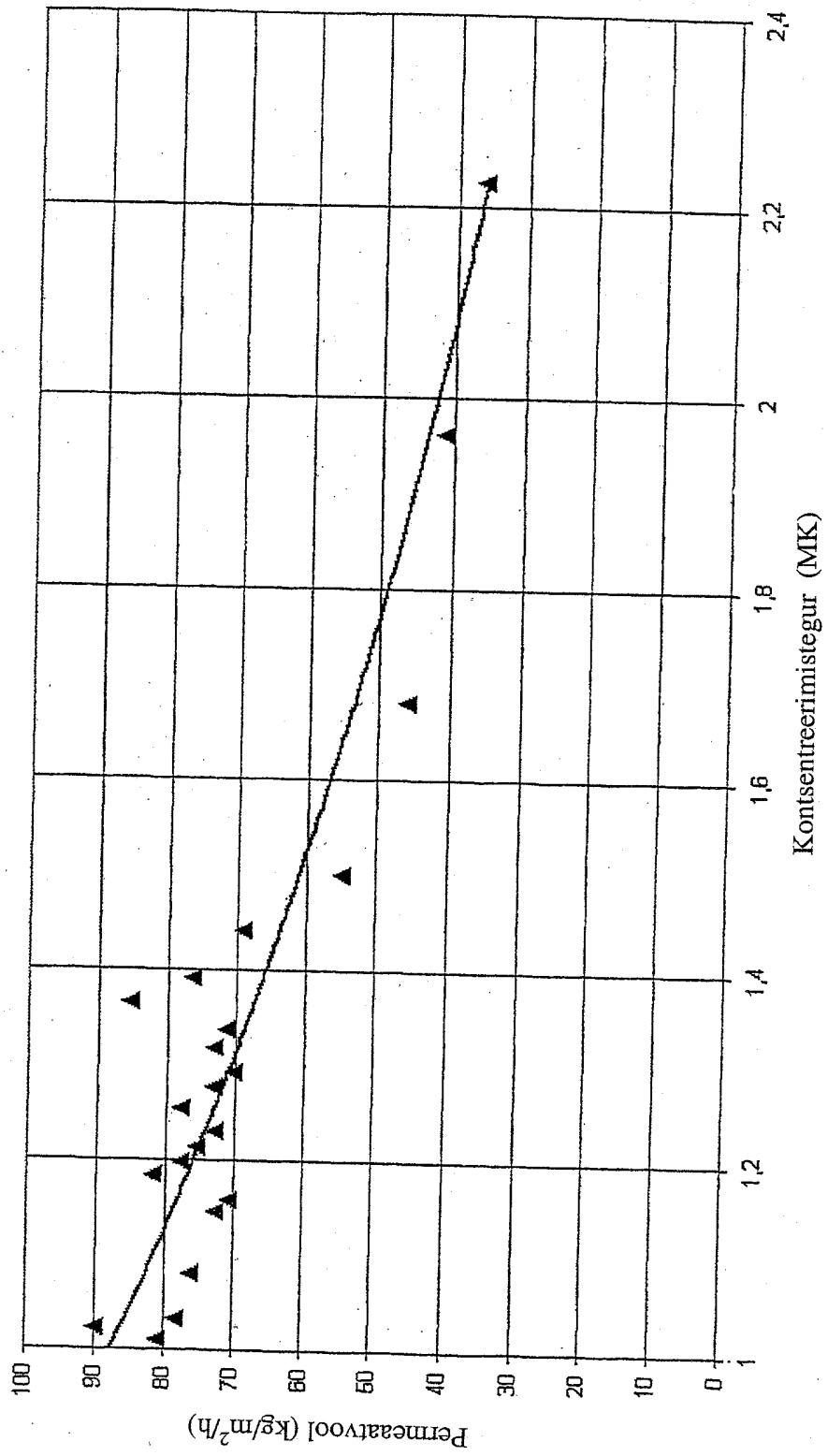


Fig. 3:

Lahutav kiht	Kandev materjal (suurema pooride läbimõõduga kui lahutav kiht)
Metall	Metall
Keraamiline materjal	Metall, klaas, keraamika või grafiit
Polümeer	Polümeer, metall, keraamika või keraamika metalli pinnal
Grafiit	Grafiit, metall või keraamiline materjal
Keraamiline materjal: nt $\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , ZrO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> , SiC, erinevate materjalide segud	
Polümeer: nt PTFE, PVDF, polüsulfoon, polüeetersulfoon, polüeetereeterketoon, polüamiid, polüpropüleen, polüakrüülnitriil	

Fig. 4:

Valmistaja	Membraani materjal	Lahutuspiir (kD) Poori läbimõõt (nm)
Atech innovations GmbH	TiO <sub>2</sub> -ga kaetud α-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /1,2	20 kD
	ZrO <sub>2</sub> -ga kaetud α-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /1,2	50 nm
	α-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -ga kaetud α-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /1,2	100, 200 nm
Rhodia/Orelis	ZrO <sub>2</sub> või TiO <sub>2</sub> -ga kaetud keraamiline materjal/1,2	15, 50, 150 kD
	ZrO <sub>2</sub> -ga kaetud grafiit/1	15, 50, 150 kD
	ZrO <sub>2</sub> või TiO <sub>2</sub> -ga kaetud keraamiline materjal/1,2	100, 200 nm
Graver Technologies	TiO <sub>2</sub> -ga kaetud teras/1	100 nm
Microdyn Modulbau GmbH	Homogeenne PP-membraan/1	200 nm
NADIR Filtrations GmbH	Polüeetersulfoon/3	5 – 150 kD
	Tselluloos/3	5 – 150 kD
	Polüakrüülnitriil	20, 40 kD
	Polüeetersulfoon/1	40, 100 kD
Berghof	Polüeeterketoonga kaetud PP/1	5 kD
	Polüsulfooniga kaetud PP/1	5 – 20 kD
	Polüamiidiga kaetud PP/1	20 kD
Stork Friesland B.V.	PVDF/1	100 nm
	PVDF/1	30 nm
Osmonics/Desal	Modifitseeritud polüakrüülnitriil/3	100 kD
	Polüsulfoon/3	40 nm
Creavis	ZrO <sub>2</sub> -ga kaetud α-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ja metall	25, 80 nm

1: torumembraan; 2: mitmekanaliline element; 3: lapikmembraan erinevate membraanimoodulite jaoks, mis on varustatud magnetsegaja või pöörlevate membraanidega

Fig. 5:

Ca-pantotenaadi lahuse kontsentreerimine; Ca-pantotenaadi algne kontsentratsioon 0,1 mol/kg ja NaCl kontsentratsioon 0,2 mol/kg

Aparatuur: magnetsegajaga kontsentreerimisrakk, maksimaalne rakendatav rõhk 120 bar

Tingimused: 30 °C/60 bar

Membran: Desal 5 DK

Proov	Kuu-päev	Märkused	Analüüs-siti	Reten-taadi alg-kogus (g)	Reten-taadi lõpp-kogus (g)	Perme-aadi lõpp-kogus (g)	Analüüsitulemused		Permeaatvool (kg/m <sup>2</sup> /h) alguses keskel lõpus	Kontsent-reerimis-tegur (MK)	Saagis		Membraani retentsiooni-võime (%)		
							algne retentaat lõpus	permeaat lõpus			1)	2)	1)	2)	
MgSO <sub>4</sub>	28.02.01		Juhtivus	1059	503	543	2,43	3,99	0,182	137	2,11	0,96	94,6		
0108V 01	01.03.01		Kloriidid Kloori-ioonid Ca Na Pantoteen-hape	1519,0	351,0	1172,6	0,201	0,145	0,212	28,1	4,33	0,17	-22,1	-14,4	
				1519,0	351,0	1172,6	0,72	0,52	0,77		4,33	0,17	0,17	-22,2	-18,1
				1519,0	351,0	1172,6	0,41	1,4	0,093		4,33	0,79	0,82	83,8	87,0
				1519,0	351,0	1172,6	0,45	0,63	0,38		4,33	0,32	0,35	23,0	28,6
				1519,0	351,0	1172,6	44,1	188	0		4,33	0,99	1,00	99,0	100,0
MgSO <sub>4</sub>	02.03.01		Juhtivus	897	495	409	2,43	4,51	0,456	96	1,81	0,91	85,3		

Märkused:

Analüüs: juhtivus ⇒ ZAT/C (mS/cm)

1) arvutatud lähtudes aine hulgast retentaadis

kloriid ⇒ määratud potentsiomeetrilise tiitrimise teel [mol/kg]

2) arvutatud lähtudes aine hulgast permeaadis

Iga filtreerimise järel vahetati membraan

Ca/Na/kloori-ioonid ⇒ ZAZ-M320 – mikroelementanalüüs (g/100 g)

Fig. 6:

Na-pantotenaadi vesilahuse (0,2 mol/l) kontsentreerimine

Aparatuur: magnetsegajaga kontsentreerimisrakk, maksimaalne rakendatav rõhk 120 bar

Tingimused: 30 °C/60 bar

Membran: Desal 5 DK

Proov	Kuupäev	Märkused	Analiisiti	Retentaadi algkogus (g)	Retentaadi lõppkogus (g)	Permeaadi lõppkogus (g)	Analüüsitulemused		Permeaatvool		Kontsentreerimis-tegur (MK)	Saagis		Membraani retentsioonivõime (%)		
							algne retentaat lõpus	retentaat lõpus	alguses keskel lõpus	(kg/m <sup>2</sup> /h)		1)	2)	1)	2)	
MgSO <sub>4</sub>	09.04.01		Juhtivus	807,0	412,2	404,2	2,33	4,07	0,126	89,6	1,96	0,89	0,97	83,0	96,1	
0108V02	09.04.01		Kloriidid	989,40	230,50	754,40	-	-	-	56,6	4,29	0,77	0,80	82,1	84,1	
																Kloorioonid
																Ca
																Na
MgSO <sub>4</sub>	09.04.01		Panto-teenhape	989,40	230,50	754,40	48,7	158,0	13,3	82,5	2,08	0,76	0,79	80,8	83,8	
																Juhtivus

Märkused:

Analüüs: juhtivus ⇒ ZAT/C (mS/cm)

1) arvutatud lähtudes aine hulgast retentaadis

Kloriid ⇒ määratud potentsiomeetrilise tiitrimise teel [mol/kg]

2) arvutatud lähtudes aine hulgast permeaadis

Membraani kasutatud alates 28.02.2001

Ca/Na/kloori-ioonid ⇒ ZAZ-M320 – mikroelementanalüüs [g/100 g]

Fig. 7:

NaCl/CaCl<sub>2</sub> ekvivalents lahuse kontsentreerimineAparatuur: 3,8 cm<sup>2</sup> kontsentreerimisrakk nr.34

Tingimused: 30 °C/50 bar

Membraan: Desal 5 DK

Proov	Kuupäev	Märksused	Analüüsiti	Reten-taadi alg-kogus (g)	Reten-taadi lõpp-kogus (g)	Perme-aadi lõpp-kogus (g)	Analüüsi tulemused		Permeaatvool (kg/m <sup>2</sup> /h)		Kont-sent-reeri-mis-tegur (MK)	Membraani retentsiooni-võime (%)		
							algne reten-taati lõpus	perme-taati lõpus	algu-ses	keskel lõpus		1)	2)	
H <sub>2</sub> O kontroll	28.09.01													
0108V01	01.10.01		Cl <sup>-</sup> Ca <sup>2+</sup> Na <sup>+</sup>	34,28 34,28 34,28	11,17 11,17 11,17	23,20 23,20 23,20	0,395 4,0 4,7	0,548 6,3 5,6	0,305 2,8 4,1	280 242	199	3,07 3,07 3,07	29,3 41,1 16,0	34,3 44,1 21,1
0108V02	01.10.01		Cl <sup>-</sup> Ca <sup>2+</sup> Na	34,22 34,22 34,22	11,28 11,28 11,28	23,13 23,13 23,13	0,395 4,0 4,7	0,533 6,4 5,8	0,305 2,8 4,1	286 249	210	3,03 3,03 3,03	27,1 42,2 19,5	34,4 44,2 21,4
H <sub>2</sub> O kontroll	01.10.01									335				

Märksused:

1) arvutatud lähtudes aine hulgast retentaadis

2) arvutatud lähtudes aine hulgast permeaadis

Cl<sup>-</sup> analüüs (ekv/kg) ⇒ potentsiomeetiline titrimine GCT/CCa<sup>2+</sup>; Na<sup>+</sup> (%) ⇒ ZAZ – M320 - mikroelementanalüüs

Membraani kasutatud alates 28.09.2001