



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **320793**

(13) **B1**

(51) Int Cl.

A21D 2/36 (2006.01)

A23K 1/14 (2006.01)

A23L 1/052 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23J 1/12 (2006.01)

A23J 3/14 (2006.01)

A23J 3/18 (2006.01)

C08B 30/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20010689	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2001.02.09	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	2001.02.09	(30)	Prioritet	2000.02.11, FR, 0001737
(41)	Alm.tilgj	2001.08.13			
(45)	Meddelt	2006.01.30			
(73)	Innehaver	Roquette Frères, 62136 LESTREM, FR			
(72)	Oppfinner	Marie-Hélène Saniez, Saint-Andre, FR			
		Thomas Erpicum, Liège, BE			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Nitrogenholdig preparat basert på hvetegluten, fremgangsmåte for fremstilling og anvendelse derav.			
(56)	Anførte publikasjoner	US-A-4179525 US-A-5962254			
(57)	Sammendrag				

Et nitrogenholdig preparat basert på vital-hvetegluten, dispergert i vandige media, inneholder pulverformig maisstøp Et slikt preparat finner anvendelse i næringsmiddelindustrien eller fermenteringsindustrien, særlig for fremstilling av antibiotika

Foreliggende oppfinnelse angår et nytt nitrogen preparat basert på hvetegluten, en fremgangsmåte for fremstilling og anvendelse derav.

Nærmere bestemt angår oppfinnelsen et preparat basert på vital-hvetegluten hvis funksjonalitet er forbedret sammenlignet med vitale glutenpreparater som er kjent ifølge teknikken.

Hvetegluten er en foretrukken bestanddel i tallrike anvendelser, særlig ved brødfremstilling, ved fremstilling av konditorvarer, sauser og i kjøtt-baserte tilberedninger.

I foreliggende oppfinnelse betyr uttrykket "vital" en nativ hvetegluten i pulverform, hverken hydrolysert eller oppløseliggjort.

Hvetegluten er proteinkomponenten som stammer fra hvete og isoleres ved liksivering (utlutning) av mel, det vil si vasking med vann av en pasta eller en deig som dannes fra mel og vann. Denne gluten, på dette trinn kalt "rågluten", er et produkt med unike visko-elastiske egenskaper. Vital hvetegluten er et kremfarvet pulver med et høyt protein-innhold (75 til 80%) som oppnås ved kontrollert tørking. Når det rehydratiseres, gjenvinner vital-gluten sine opprinnelige visko-elastiske egenskaper. Det inneholder også 6 til 8% fosfolipider, rundt 10% rest-stivelse, rundt 1% aske (rest ved forbrenning) og 4 til 6% vann. Det er uoppløselig i vandige oppløsninger nær nøytralitet (pH 4 til 8). På grunn av de sterkt hygroskopiske egenskaper har pulveret en tendens til agglomerering til en enkelt visko-elastisk masse. Denne tendens er særlig uønsket ved alle de anvendelser som krever at gluten skal dispergeres i vandige media, fordi klumpene som dannes er meget vanskelige å bli kvitt og dispergere på korrekt måte.

Særlig er vital-hvetegluten, av de ovenfor forklarte grunner, meget vanskelig å benytte i en fermenter i fermenteringsindustrien. Således utgjør dette et hinder for forbindelsens anvendelse på dette området selv om det kunne vært en meget attraktivt kilde for vegetabilsk protein sammenlignet med andre kilder som i dag er i bruk, for eksempel bomullsmel eller soyamel. Bortsett fra omkostningene ved de sistnevnte, er det høye debris-innhold (rundt 20%) og særlig et høyt innhold av cellulose, en mangel for fermenteringsindustrien som søker maksimal renhet og biotilgjengelighet for næringssubstrater som benyttes. Tatt i betraktning det faktum at den ikke er hydrolysert, utgjør vital-gluten en kilde for aminosyrer og peptider med progressiv frigivning i fermenteringsmedia, noe som er spesielt gunstig i visse trinn av produksjonen av metabolitter.

Løsninger er foreslått, blant annet emulgering av gluten i en mineral- eller vegetabilsk olje i nærvær av en emulgator (US 4 396 637), men det oppnådde preparat er uegnet for bruk i et fermenteringsmedium.

5

US 3 704 131 beskriver en sofistikert metode for tørking av gluten på et hvirvelsjikt og så ved forstøvning.

Efter å ha vist at dispersjonen av gluten i oppløsninger av svake syrer som melke-,
10 propion-, eddik- og sitronsyre ikke var tilfredsstillende på grunn av den dårlige kvalitet for den oppnådde gluten, foreslår innehaverne av CA 571 316 behandling av gluten med karbondioksyd under høyt trykk før tørking ved forstøvning.

Til slutt foreslår US 4 179 525 dispergering av hvetegluten med fin partikkelstørrelse
15 (mindre enn 350 μm og fortrinnsvis lik rundt 150 μm) ved hjelp av et additiv, også med en fin partikkelstørrelse og bestående av et ikke-denaturert, globulært protein som særlig soyamel. Ideelle andeler for soyamel som spesifisert var mellom 3 og 15 vekt-%, beregnet på vekten av gluten, men denne oppløsning ga tilfredsstillende resultater kun for meget fine partikkelstørrelser og kun med et ikke-denaturert, globulært protein-
20 additiv.

Soyamel er ikke noe ideelt substrat for fermenteringsmedia på grunn av at det meget ofte er sterkt kontaminert med bakterier og på grunn av vanskelighetene ved sterilisering av et slikt stivelsesrikt produkt. Således inneholder soyamel rundt 12% stivelse. I tillegg viser det spor av oppløsningsmidler som stammer fra ekstraheringen av soyaolje
25 og inneholder anti-proteasefaktorer som kan forårsake problemer.

Preparater basert på hvetegluten og mais-støpevann er også kjent som beskrevet i US 5 962 254 i foreliggende søkers navn. Således oppnås det der hvetegluten som er
30 hydrolysert med støpevann og et preparat av hydrolyserte proteiner med lav molekylvekt.

Det foreligger således et utilfredsstillt behov for et vital-hvetegluten-preparat som er dispergerbart i et vandig medium og som særlig er brukbar ved fremstilling av fermenteringsmedia som erstatning for soya- og bomullsmel eller gjærekstrakter.
35

Foreliggende søkere har, efter et grundig studium av problemet, funnet at dette mål kan oppnås ved å innarbeide maisstøp i hvetegluten, der begge foreligger i form av pulver. Overraskende og uventet er det nitrogenholdige preparat som oppnås meget lett dispergerbart i vann og utgjør i realiteten et foretrukket substrat ved fermentering.

5

Således angår foreliggende oppfinnelse et nitrogenholdig preparat basert på vital-hvetegluten, dispergerbart i vandig medium, og som kjennetegnes ved at det omfatter minst 20% pulverformig maisstøp, idet denne prosentandel er uttrykt som vekt beregnet på vekten av vital-hvetegluten. Maisstøp som oppnås ved å fordampe støpevannet som
10 stammer fra maisstivelsesindustrien, er kjent for å være en meget attraktiv kilde for nitrogen i fermenteringsindustrien. Det benyttes i de fleste biologiske produksjonsprosesser for antibiotika, vitaminer, organiske syrer og enzymer. Det er også benyttet for fremstilling av biomasse. Hovedattraktiviteten for maisstøp skyldes den spesielle sammensetning på grunn av overføring og transformasjon ved
15 melkesyrefermentering av de oppløselige materialer som inneholdes i maiskornene.

Foreliggende søkere har funnet at å innarbeide det i pulverform i vital-hvetegluten ga en forblending som var lett dispergerbar i vandig oppløsning og at hvetegluten som er bragt i oppløsning på denne måte mot alle teorier mister sin evne til reagglomerering til
20 en enkelt visko-elastisk masse.

Således tilveiebringes det en balansert, nitrogenholdig blanding inneholdende høymolekylvektspoteiner som er særlig attraktive for langsom frigivning av peptider og aminosyrer i fermenteringsmedium. Således kan dette nitrogenholdige preparat med fordel
25 benyttes som en "forsinket" form som tillater den progressive frigivning av aminosyrer som er brukbar for biomasseproduksjon, idet proteinene tillater fremstilling av metabolitter.

Det nitrogenholdige preparat ifølge oppfinnelsen omfatter minst 20% pulverformig maisstøp, idet denne prosentandel er uttrykket på vektbasis i forhold til vekten av vital-gluten. En slik andel er nødvendig for å oppnå en tilfredsstillende dispergering av hvetegluten.

Pulverformig maisstøp betyr for eksempel den maisstøp som er kommersielt tilgjengelig
35 fra foreliggende søkere under varemerket Solulyx® AST eller alternativt den pulverformige maisstøp som beskrevet i foreliggende søkeres søknad FR 99 0433392.

Når det gjelder den angjeldende vital-hvetegluten, er det mulig med fordel å benytte det produkt som markedsføres av foreliggende søkere under betegnelsen Viten®.

For å fremstille preparatet ifølge oppfinnelsen blir ganske enkelt de to valgte pulvere
5 blandet sammen. Man kan godt ta sikte på en samtørring av gluten og maisstøp for å
oppnå en pulverformig blanding. Hva angår partikkelstørrelsen for preparatet ifølge
oppfinnelsen har rundt 60% av partiklene en størrelse over 50 mikron og rundt 1% av
partiklene har en størrelse mindre enn 200 mikron.

10 På den annen side ligger den tilsynelatende volummasse for preparatet ifølge oppfinnel-
sen i området 0,5 kg/liter.

I henhold til en foretrukken variant av oppfinnelsen, omfatter det nitrogenholdige prepa-
rat ifølge oppfinnelsen rundt 20 til 80%, fortrinnsvis 25 til 75 vekt-% pulverformig
15 maisstøp, idet disse prosentandeler uttrykkes under henvisning til vekten av vital-hvete-
gluten. Avhengig av den ønskede anvendelse er det således mulig å fremstille blan-
dinger med forskjellige andeler gluten:maisstøp alt etter hvorvidt det er et behov for et
preparat inneholdende høymolekylvektspoteiner eller heller et preparat med mer
peptider og aminosyrer.

20 Det nitrogenholdige preparat ifølge oppfinnelsen kjennetegnes også ved et innhold av
fritt prolin mellom 200 og 1000 mg/100 g tørrvekt, et innhold av fri alanin mellom 500
og 1500 mg/100 g tørrvekt og et innhold av fritt leucin mellom 400 og 1200 mg/100 g
tørrvekt. Disse frie aminosyrer måles i preparatet ved kromatografiske teknikker slik det
25 vanligvis benyttes for dette formål.

Ifølge oppfinnelsen inkluderer det nitrogenholdige preparat melkesyre som stammer
særlig fra maisstøpen. Særlig kjennetegnes det ved et melkesyreinnhold lik større enn
3% på tørrstoffbasis. Melkesyren bedømmes ved pH-måling i henhold til følgende
30 metode:

Rundt 50 ml destillert vann bringes i et 100 ml begerglass. En testprøve på rundt 5 g,
veiet nøyaktig, av prøven som skal analyseres, settes til under omrøring. Denne opp-
løsning overføres til en 100 ml volumetrisk kolbe, toppes med destillert vann og det
35 settes hen under omrøring i 30 minutter.

Derefter blir 20 ml av denne oppløsning overført til et 250 ml begerglass. Rundt 70 ml destillert vann tilsettes og pH-verdien bringes til 8 med 0,1N kaustisk soda under kontroll ved pH-målinger.

- 5 Mengden melkesyre uttrykkes ved den følgende formel: % melkesyre som andel av tørrvekten = $V/P \cdot 9/2$, der V er volumet av soda som tilsettes i ml og P er vekten av prøven i g.

- Til slutt kjennetegnes preparatet ifølge oppfinnelsen ved et totalt fosforinnhold lik eller
10 større enn 1 vekt-%, beregnet på tørrstoff. Analysen av totalt fosfor gjennomføres i henhold til standarden ISO 3946, som er basert på destruering av organisk materiale i produktet som skal analyseres på en måte som omdanner alt organisk fosfor til uorganisk fosfor, ved mineralisering ved bruk av en sulfo-salpeterblanding og ved omdanning av fosfateter til ortofosfater. Det neste trinn består i tildanning av et molybden-
15 kompleks og så måling av absorbansen ved en bølgelengde på 825 nm.

- Videre angår foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et nitrogenholdig preparat, kjennetegnet ved at den omfatter blanding av vital-hvetegluten og pulverformig maisstøp på en slik måte at det oppnås et preparat som er dispergerbart
20 i vandige media, i henhold til foreliggende oppfinnelse.

- Takket være de spesielle egenskaper, har det nitrogenholdige preparat ifølge oppfinnelsen en særlig betydning for bruk som mikrobielt vekstsubstrat i fermenteringsindustrien. Man oppnår således utmerkede resultater ved fremstilling av biomasse og disse resul-
25 tater er distinkt bedre enn de tilgjengelige nitrogensubstrater som særlig soya- eller bomullsmel. Det er særlig godt egnet ved fremstilling av antibiotika som blant annet cefalosporiner eller penicilliner. I tillegg kan det være av interesse i næringsmiddelindustrien på grunn av nærings- og smaksegenskapene, og vil således benyttes i preparater som er ment for human- eller animalnæring.

- 30 Følgelig angår foreliggende oppfinnelse anvendelse av et preparat ifølge oppfinnelsen eller som oppnådd ifølge fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen som substrat for produksjon av antibiotika.

- 35 Videre angår oppfinnelsen anvendelse av et preparat ifølge oppfinnelsen eller oppnådd ifølge fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen som næringsmiddel eller næringsmiddeladditiv i blandinger ment som dyrefôr.

Oppfinnelsen angår også anvendelse av et preparat ifølge oppfinnelsen eller oppnådd ifølge fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen som næringsmiddel eller næringsmiddeladditiv i blandinger ment for humannæring.

5

Videre kan også preparatene ifølge oppfinnelsen inneholde forskjellige additiver og drøymidler som mineraler, vitaminer, aminosyrer, preserveringsmidler, fargestoffer og andre næringsstoffer som er i stand til å supplere preparatet, særlig når det gjelder bruken som nitrogenkilde i fermenteringsmedia.

10

Andre egenskaper og fordeler ved oppfinnelsen vil fremgå av de følgende, illustrerende eksempler.

Eksempel 1

- 15 Vital-gluten (Viten®) og enzymatisk hydrolysert, oppløselig gluten (Viten®CWS) sammenlignes med tre blandinger av vital-gluten og forstøvet maisstøp (Solulys®AST) i henhold til oppfinnelsen når det gjelder dispergerbarheten i vann. Tre preparater fremstilles ifølge oppfinnelsen, nemlig preparatene A, B og C inneholdende respektivt maisstøp:glutenforhold på 1:1, 1:3 og 1:4, noe som betyr 50%, 25% og 20% maisstøp i
20 forhold til gluten.

- Derefter oppløses 300 g av disse forskjellige preparater i vann til et tørrstoffinnhold på 15% og de oppnådde oppløsninger filtreres umiddelbart på en 1000 mikron sikt. Resten som er tilbake på sikten veies og utgjør den første masse m1. Preparatet settes så hen i 1
25 time, hvorefter det filtreres igjen. Den veiede rest utgjør den andre masse, m2. Desto større resten m1 er, jo dårligere er dispergerbarheten for produktet. Desto større resten m2 er, jo mindre stabil er dispergerbarheten for produktet med tiden.

Disse operasjoner gjentas for de forskjellige preparater som skal bedømmes.

30

Resultatene er oppsummert i tabellen.

Prøvet preparat	Forhold m1:m2 (i g før og etter filtrering)
Viten®	152:9,2
Viten®CWS	7,9:16
A (1:1)	2:0,9
B (1:3)	7:11,5
C (1:4)	28:19

Vital-gluten oppløst i vann gir alene en visko-elastisk masse som er vanskelig å blande,
5 noe som forklarer den store rest m1 som oppnås etter filtrering.

Preparatene A, B og C gir meget tilfredsstillende resultater: meget god dispergerbarhet
for vital-gluten oppnås, ekvivalent dispergerbarheten for et enzymatisk hydrolysert
gluten (Viten®CWS). Denne dispergerbarhet er stabil over et visst tidsrom som vist ved
10 restene m2, som er relativt små.

Under 20% maisstøp blir det umulig å dispergere preparatet riktig, og det vender da
tilbake til den oppførsel som er karakteristisk for vital-hvetegluten, brukt alene.

15 Eksempel 2

Preparat A ifølge oppfinnelsen benyttes, fremstilt på forhånd med 50% vital-gluten og
50% pulverformig maisstøp.

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 dyrkes i en 100 ml Erlenmeyer-kolbe inne-
20 holdende 50 ml flytende næringsmedium bestående av glukose i en mengde av 10 g/l,
CaCO₃ i en mengde av 2 g/l og en nitrogenkilde i en mengde av 0,1 g/l nitrogen totalt.

Dette medium ympes med 2% av en forkultur bestående av glukose i en mengde av 10
g/l, CaCO₃ i en mengde av 2 g/l og gjærekstrakt i en mengde av 2 g/l.

25

Dette forkulturmedium ympes med et kvadrat av en agar-kultur av den koloni som ble
oppnådd etter inkubering i 24 timer ved 45°C.

Forkulturen inkuberes i 24 timer ved 45°C med roterende agitering ved 80 omdr./min. Etter ymping av produksjonsmediet i en hastighet av 2%, blir det siste i sin tur inkubert i 24 timer under de samme betingelser som forkulturen.

- 5 Kinetiske prøver tas for å bedømme cellulær levedyktighet ved strømningscytometri-analyse. Denne teknikk muliggjør analyse av flere cellulære karakteristika. For eksempel tillater den i en gitt cellepopulasjon samtidig differensiering mellom levedyktige og ikke-levedyktige mikroorganismer og tillater at disse telles nøyaktig. Tellingene gjennomføres ved måling av den fluorescens som avgis av mikroorganismer som på
- 10 forhånd er merket med spesielle fluorkromer ved bruk av strømningscytometri som Chem Flow® Autosystem med laser-detektering, markedsført av Chemunex Company. Metoden omfatter tre faser, bestående først av merking av levedyktige mikroorganismer ved å bringe dem til assimilering av et ikke-fluorescent substrat som er i stand til å gå gjennom deres cellemembran. Dette ikke-fluorescente substrat blir derefter hydrolysert
- 15 av de cytoplasmiske esteraser og danner en forbindelse som avgir grønn og rød fluorescens under laser-eksitering. Kun de levedyktige celler merkes på denne måte. Den andre fase består i merking av de ikke-levedyktige mikroorganismer, noe som skjer ved en ADN-spesifikk reagens som avgir rød fluorescens under laser-eksitering. Til slutt kommer den tredje fase som omfatter analysering av den cellulære suspensjon i
- 20 strømningscytometri-analysøren. De merkede mikroorganismer avgir et fluorescens-signal som analyseres i det grønne og i det røde ved bruk av to meget sensitive detektorer. Det totale antall levedyktige og ikke-levedyktige mikroorganismer bestemmes så i det røde, mens antallet levedyktige mikroorganismer bestemmes beregnet på det fluorescente grønne signal.

25

Efter å ha tatt et cellepreparat som skal testes, inneholdende rundt $5 \cdot 10^6$ cfu/ml (cfu = colony-forming units), gjennomføres de følgende trinn:

- til et 3 ml rør bringes 100 µl av den homogeniserte celleduspensjon blandet med 900
- 30 µl av viabilitetsmerkelappopløsninger, markedsført av Chemunex Company,
- rørene homogeniseres og inkuberes i 10 minutter ved 30°C,
- rørene bringes i is og settes mørkt for å stanse reaksjonen,
- til andre 3 ml rør bringes 100 µl av celleduspensjonen blandet med 900 µl av mortalitetsmerkingsopløsningen,
- 35 - rørene homogeniseres og inkuberes i 10 minutter i is og i mørke.

Målingene gjennomføres så ved bruk av et Chem Flow® Autosystem 3 på følgende måte (etter kalibrering ved bruk av en standard som spesielt er fremstilt for analyse av suspensjoner av bakterier):

- 150 µl av suspensjonen merkes med en levedyktighetsmerkelapp blandes med 150 µl av suspensjonen merket med mortalitetsmerkelappen,
- 1,2 ml reagens ChemSol B7 tilsettes og målingene utføres på 225 µl.

Instrumentet gir en TC (total count = total telling) tilsvarende det totale antall evenementer som telles under analysen og en GC-verdi tilsvarende antall levende celler.

- Levedyktighetsprosenten bestemmes ved forhold $(GC/TC) \cdot 100$. Resultatene uttrykkes som en prosentandel av levende celler blant den totale populasjon som er til stede pr. ml væske.

- Preparat A, som sammenlignes med soyamel og bomullsmel, benyttes som nitrogenholdig kilde.

Alle tre av disse nitrogenholdige preparater benyttes i en konsentrasjon som muliggjør 0,1 g/l total nitrogen-input i mediet.

- De tre kulturmedia ympes med den samme forkultur for å muliggjøre at de oppnådde resultater kan sammenlignes.

Resultatene er oppsummert i tabellen:

	Total populasjon (CFU*)	Levedyktig populasjon
Preparat A 1,05 g/l	$4,5 \cdot 10^8$	100%
Soyamel (1,2 g/l)	$1,7 \cdot 10^8$	94%
Bomullsmel 1,05 g/l	$1,6 \cdot 10^8$	97%

*CFU = Colony-Forming Units

Bruken av preparatene ifølge oppfinnelsen tillater at det oppnås en total populasjon av *Lactobacillus plantarum* som er 2,7 ganger tettere enn det som oppnås med soya- og bomullsmel.

Eksempel 3

Saccharomyces cerevisiae ATCC 18824 dyrkes i 100 ml Erlenmeyer-kolber inneholdende 20 ml flytende næringsmedium bestående av glukose i en konsentrasjon av 10 g/l og en nitrogenkilde i en mengde av 0,1 g/l totalt nitrogen.

Dette medium ympes i et nivå av 2% med en forkultur bestående av glukose i en konsentrasjon på 10 g/l og gjærekstrakt i en konsentrasjon av 2 g/l. Dette forkulturmedium ympes med et kvadrat av en agar-kultur fra kolonien som oppnås etter 24 timers inkubering ved 37°C.

Forkulturen inkuberes i 24 timer ved 37°C med roterende agitering ved 200 omdr./min.

Efter ymping av produksjonsmediet ved 2%, blir det sistnevnte i sin tur inkubert i 24 timer under de samme betingelser som forkulturen.

Prøvene tas kinetisk for å bedømme den cellulære levedyktighet ved strømningscytometrianalyser. Resultatene uttrykkes som prosentandel levende celler blant den totale populasjon som er til stede pr. ml væske. De nitrogenholdige kilder som studeres er Preparat A, soyamel og bomullsmel. Alle tre benyttes i en konsentrasjon som gjør at 0,1 g/l totalt nitrogen kan mates til mediet. De tre kulturmedia ympes med den samme forkultur.

De oppnådde resultater er oppsummert i tabellen.

25

	Total populasjon (CFU*)	Levedyktig populasjon
Preparat A 1,05 g/l	$9,4 \cdot 10^6$	80%
Soyamel (1,2 g/l	$4,6 \cdot 10^6$	78%
Bomullsmel 1,05 g/l	$5,7 \cdot 10^6$	85%

Bruken av preparatet ifølge oppfinnelsen tillater at det kan oppnås en total populasjon og en levedyktig populasjon av Saccharomyces cerevisiae som er så å si dobbelt så tett som den som oppnås ved bruk av soyamel og bomullsmel.

Eksempel 4

Bacillus subtilis ATCC 6051 dyrkes i en 100 ml Erlenmeyer-kolbe inneholdende 20 ml flytende næringsmedium bestående av en konsentrasjon i en mengde av 10 g/l og en
5 nitrogenkilde i en mengde av 0,1 g/l totalt nitrogen.

Dette medium ympes i en mengde av 2% med en forkultur bestående av glukose i en mengde av 10 g/l og gjærekstrakt i en mengde av 2 g/l. Dette forkulturmediet ympes med et kvadrat av en agar-kultur av den koloni som ble oppnådd etter 24 timers
10 inkubering ved 30°C. Forkulturen inkuberes i 24 timer ved 30°C med roterende omrøring med 200 omdr./min.

Efter ymping av produksjonsmediet i et nivå av 2%, ble det sistnevnte så satt hen for inkubering i 24 timer under de samme betingelser som forkulturen.

15

Prøver tas kinetisk for å bedømme cellelevedyktigheten ved strømningscytometrisk analyse. Resultatene uttrykkes som prosentandel levende celler blant den totalt tilstedeværende populasjon pr. ml væske.

20 De studerte nitrogenholdige væsker er Preparat A, soyamel og bomullsmel. Alle tre benyttes i en konsentrasjon som muliggjør input av 0,1 g/l totalt nitrogen i mediet. De tre medier ympes med den samme forkultur.

De oppnådde resultater er oppsummert i tabellen.

25

	Total populasjon (CFU*)	Levedyktig populasjon
Preparat A 1,05 g/l	$2,1 \cdot 10^8$	95%
Soyamel (1,2 g/l	$305 \cdot 10^6$	35%
Bomullsmel 1,05 g/l	$1,5 \cdot 10^6$	50%

Bruken av preparatet ifølge oppfinnelsen tillater å oppnå en total populasjon av Bacillus subtilis som er ekstremt tett og perfekt levedyktig, noe som soya- og bomullsmel ikke tillater.

Disse resultater viser den perfekte egnethet for det nye preparat ifølge oppfinnelsen som nitrogenkilde for en kultur av *Bacillus subtilis*.

P a t e n t k r a v

1.

Nitrogenholdig preparat, basert på vital-hvetegluten, dispergerbar i vandige media,
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter minst 20%
 pulverformig maisstøp, idet denne prosentandel er uttrykt som vekt beregnet på vekten
 av vital-hvetegluten.

2.

10 Nitrogenholdige preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at det omfatter 20 til 80%, fortrinnsvis 25 til 75% pulverformig maisstøp, idet
 disse prosentandeler er uttrykt som vekt, beregnet på vekten av vital-hvetegluten.

3.

15 Nitrogenholdige preparat ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at det har et innhold av fritt prolin mellom 200 og 1000 mg/100 g tørrstoff, et
 innhold av fritt alanin mellom 500 og 1500 mg/100 g tørrstoff og et innhold av fritt
 leucin mellom 400 og 1200 mg/100 g tørrstoff.

20 4.

Nitrogenholdige preparat ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, k a r -
 a k t e r i s e r t v e d at det inneholder et melkesyrenivå lik eller
 større enn 3 vekt-% tørrstoff.

25 5.

Nitrogenholdige preparat ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, k a r -
 a k t e r i s e r t v e d at det inneholder et totalt fosfornivå lik eller
 større enn 1% tørrstoff.

30 6.

Fremgangsmåte for fremstilling av et nitrogenholdig preparat, k a r a k -
 t e r i s e r t v e d at den omfatter blanding av vital-hvetegluten og
 pulverformig maisstøp på en slik måte at det oppnås et preparat som er dispergerbart i
 vandige media, i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 5.

35

7.

Anvendelse av et preparat ifølge et av kravene 1 til 5 eller som oppnådd ifølge krav 6, som substrat for produksjon av antibiotika.

5 8.

Anvendelse av et preparat ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 eller oppnådd ifølge krav 6 som næringsmiddel eller næringsmiddeladditiv i blandinger ment som dyrefôr.

10 9.

Anvendelse av et preparat ifølge et av kravene 1 til 5 eller oppnådd ifølge krav 6, som næringsmiddel eller næringsmiddeladditiv i blandinger ment som humannæring.