

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 881496 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **881496**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12P 13/04

C12P 13/08

C12P 13/12

A23K 1/16

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.03.1988**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.03.1988**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.10.1988**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

06.04.1987 NL 8700803

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Gist-Brocades N.V., Wateringseweg 1, 2600 MA Delft, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Slijkhuis, Harmen, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

2 •Sanders, Johan Pieter Marinus, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä aminohappojen valmistamiseksi tai uuttamiseksi lannasta

Förfarande för framställning eller extraktion av aminosyror ur dynga

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

21475 ATCC
21798 ATCC

21516 ATCC
21859 ATCC

21518 ATCC

21608 ATCC

Menetelmä aminohappojen valmistamiseksi ja uuttamiseksi lannasta

Keksinnön kohteena on menetelmä aminohappojen, erityisesti L-aminohappojen, kuten L-lysiinin (kutsutaan jäljempänä lysiiniksi) tai L-metioniinin (kutsutaan jäljempänä metioniniksi) valmistamiseksi lannasta, erityisesti puolineste-mäisestä sian lannasta.

Länsimaisessa yhdyskuntaelämässämme eläinten ulosteet muodostavat yhä uhkaavamman ongelman. Voimaperäinen karjankasvatus, erityisesti siiankasvatus, tuottaa suuria määriä lantaa, jota ei voida riittävässä määrin käyttää maanviljelyksessä tuotantopaikan välittömässä läheisyydessä. Kuljetus kauempana oleviin jakelupisteisiin tuotantopisteistä aiheuttaa suuria kustannuksia. Toinen mahdollinen tapa lantaongelman ratkaisemiseksi tai sen pitämiseksi jollain tavalla kontrollissa, on lannan sopiva käsittely, jolloin lanta muunnetaan tuotteiksi, jotka eivät ole haitallisia tai ovat vähemmän haitallisia ympäristölle tai joita voidaan mahdollisesti jopa käyttää hyödyksi. Tässä yhteydessä kannattaa pitää mielessä esimerkiksi anaerobinen fermentointi, aerobinen stabilointi ja biomassan tuotanto.

Anaerobisessa fermentoinnissa syntyy metaanirikasta kaasua, jota voidaan käyttää kattamaan mainitun prosessin kustannukset kokonaan tai osittain. Tämä ei kuitenkaan ratkaise typpi-ongelmaa eikä muita lantaongelmaan liittyviä ongelmia, kuten fosfaatti-ongelmaa. Anaerobisessa puhdistuksessa syntyvä effluentti sisältää edelleen typpeä, pääasiassa ammoniakin muodossa ja lisäksi fosfaatteja ja kuparisuoloja.

Aerobinen stabilointi on suhteellisen kallista, koska prosessissa tarvitaan happea. Typpi on osittain sitoutunut solumateriaalin muodossa. Tuotettua lietettä voidaan tietyissä tapauksissa käyttää eläinrehun aineosana.

Biomassan tuotanto lannasta proteiinirikkaiden mikro-organismien, esimerkiksi hiivojen avulla, on eräänlainen aerobinen stabilointimenetelmä, jossa käytetään valittuja mikro-organismeja. Se on suhteellisen kallis prosessi. Tuotteella (lietteellä) on tietty ravintoarvo, mutta hyödyllisten ravintoaineiden pitoisuus on suhteellisen pieni, joten sen käyttö ei ole houkuttelevaa ja tietyissä tapauksissa, kuten esimerkiksi modernissa tehdasmaisessa maanviljelyssä, siitä syystä käyttö jopa estyy. Jos lannasta biomassaa tuotettaessa on tarkoitus saada tuote, jolla on suurempi ravintoarvo, lanta on ensin erotettava esimerkiksi vesiliukoiseen ja veden liukenemattomaan osaan ja biomassaa on tuotettava vesiliukoisen osan avulla, jotta tällä tavalla saataisiin erottamaan arvokas biomassaa kiinteistä aineista, joilla on alhainen ravintoarvo.

Pääosa sianrehusta koostuu viljasta, soijasta, tapiokasta ja muista hiilihydraatti- ja proteiinilähteistä. Viljan proteiineissa on suhteellisen vähän välttämättömiä aminohappoja lysiiniä, metioniinia, treoniinia ja tryptofaania. Tiettyjen vitamiinien ja kasvua edistävien aineiden lisäksi näitä aminohappoja sen vuoksi usein lisätään rehuun. Tähän tarvittavia aminohappoja tuotetaan usein mikrobiologisesti L-muodossa käyttäen sopivaa mikro-organismia erityisesti tähän tarkoitukseen valmistetussa ravintoalustassa (ks. esimerkiksi FR-A-2,541,867 ja US-A-3,729,381). Myös kemiallinen synteesi on mahdollinen, silloin kuitenkin joudutaan tekemisiin stereoisomeeriongelmien kanssa, jotka pyrkivät nostamaan kustannuksia. Kemiallisilla synteeseillä päädytään tavallisesti rasemaatteihin, siten että rasemaattien erottaminen on välttämätöntä optisesti puhtaiden aminohappojen valmistamiseksi.

Nyt on yllättäen havaittu, että tiettyjä arvokkaita aminohappoja, kuten lysiiniä ja metioniinia voidaan tuottaa mikrobiologisesti käyttäen lantaa ravintoalustana.

Keksinnön kohteena on siten menetelmä arvokkaiden aminohappojen, kuten välttämättömien aminohappojen lysiinin tai metioniinin valmistamiseksi ja uuttamiseksi kotieläinten (siat, nautakarja ja siipikarja) lannasta pastöroimalla tai steriloidimalla ja sen jälkeen ympäämällä lanta bakteereilla, jotka kykenevät tuottamaan mainittuja aminohappoja, ja annetaan bakteerien kasvaa lannassa, minkä jälkeen mainitut aminohapot eristetään seoksesta.

Bakteerit, jotka kykenevät tuottamaan aminohappoja, joihin viitattiin, kuuluvat sukuihin Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Escherichia, Microbacterium, Micrococcus ja Pseudomonas. Erityisesti "coryneform"-bakteereihin kuuluvat lajit, joita ovat Arthrobacter, Brevibacterium ja Corynebacterium, näyttävät olevan erityisen sopivia. Sopivia lajeja ovat esimerkiksi Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum, Corynebacterium glutamicum, Arthrobacter SP B-1 ja niiden mutantit. Spesifisiä esimerkkejä lysiinin ja metioniinin valmistamiseksi ovat lajit, joilla on seuraavat talletusnumerot: Brevibacterium flavum ATCC 21475, Brevibacterium flavum ATCC 21518, Brevibacterium lactofermentum ATCC 21798, Corynebacterium glutamicum ATCC 21608, Corynebacterium glutamicum ATCC 21516, Arthrobacter SP B-1 ATCC 21859.

Kotieläinten lanta näyttää olevan erityisen sopivaa käytettäväksi keksinnön mukaisessa menetelmässä. Puolinestemäinen sian lanta näyttää antavan erinomaisia tuloksia. Puolinestemäinen lanta pastöroidaan tai steriloidaan ensin mikro-organismien ei-toivottavan kasvun estämiseksi ja patogeenisten mikro-organismien tappamiseksi. Keksinnön mukainen menetelmä voidaan haluttaessa suorittaa niin kutsutulla puolinestemäisen lannan "supernatantilla", ts. vesipitoisella nesteellä, joka saadaan dekanttoimalla laskeutumisen jälkeen

tai sentrifugoimalla puolinessemäinen lanta, ja joka sisältää puolinessemäisen lannan kaikki vesiliukoiset aineosat.

Lannan koostumus voi vaihdella laajoissa rajoissa ja se riippuu mm. eläintyyppistä, josta lanta on peräisin (esim. siat, nautakarja, siipikarja), ja tavasta, jolla lanta kerätään. Sikojen tai lehmien puolinessemäisen lannan kuiva-ainepitoisuus on tavallisesti pienempi kuin 10 paino-%, tavallisesti 8-9 paino-%; orgaanisten aineiden pitoisuus on tavallisesti 5 paino-%:n paikkeilla; kokonaistyyppipitoisuus vaihtelee 0,35:n ja 0,65 paino-%:n välillä ja fosfaattipitoisuus on 0,4 - 0,5 paino-% (P_2O_5). "Kiinteämmän" lannan kosteuspitoisuus on 65-85 paino-%, orgaanisten aineiden pitoisuus 10 - 20 paino-%, kokonaistyyppipitoisuus 0,6 - 1,0 paino-% ja fosfaattipitoisuus (P_2O_5) 0,5 - 0,9 paino-%.

Ottaen huomioon puolinessemäisen lannan C/N-suhteen, puolinessemäiseen lantaan kannattaa lisätä tietty määrä hiililähdettä, jotta läsnäoleva tyyppimäärä voitaisiin käyttää hyväksi niin ideaalisesti ja täydellisesti kuin mahdollista. Esimerkiksi melassia, glukoosia tai sakkaroosia voidaan käyttää lisättävänä hiililähteenä. Tämä menetelmä tekee myös mahdolliseksi käyttää sokeria sisältäviä jättemateriaaleja, kuten sokerijuurikasmassaa, ja tarkemmin sanottuna, sellainen määrä, joka vastaa aina 200 g glukoosia kiloa kohti lantaa, edullisesti vähemmän kuin 100 g glukoosiekvivalentteja kiloa kohti lantaa.

Jos menetelmä suoritetaan koko lannalla eikä vain supernatantilla, voi olla edullista lisätä lantaan tiettyjä entsyymejä ja erityisesti tärkkelystä hajottavia ja/tai selluloosaa hajottavia entsyymejä, esimerkiksi amylaasia ja/tai sellulaasia. Tällä tavoin suurempi osa lannassa läsnäolevasta hiililähteestä voidaan edullisesti käyttää aminohappojen mikrobiologiseen synteesiin. Tällaisten entsyymien lisäys voi jopa tehdä tarpeettomaksi edellä mainitun hiililähteen

lisäämisen lantaan. Tällä tavoin lantaan on myös mahdollista lisätä halpaa tärkkelystuotetta tai selluloosaa sisältävää materiaalia (esimerkiksi maatalousjätettä) yllä hiililähteinä mainittujen sokereiden lisäksi tai niiden sijasta. Menetelmän tehokkuutta voidaan tällä tavalla lisätä edelleen ja pienentää lantaongelma minimiin. Kuvattu menetelmä tekee mahdolliseksi entsyymien vaikuttamisen ennen käymisprosessia, mieluummin kuitenkin sen aikana. Entsyymikustannuksissa voidaan edelleen säästää lähtemällä mikro-organismeista, jotka itse kykenevät amylaasi-, pektinaasi-, hemisellulaasi- ja/tai sellulaasituotantoon, mahdollisesti kloonaamalla niihin ensin tarvittavat geenit.

Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetut aminohapot ovat reaktioseoksessa liukoisessa muodossa. Loppukäsittely aiheuttaa sen vuoksi joitakin ongelmia. Kiinteät aineosat erotetaan ensin lietteestä, esimerkiksi sentrifugoimalla tai suodattamalla. Aminohappo voidaan eristää vesifaasista esimerkiksi sopivan ioninvaihtajan, kuten voimakkaasti happaman H- tai NH_4 -muodossa olevan kationinvaihtajan avulla. Aminohappo voidaan saada puhtaassa muodossa eluoimalla tavanomaiseen tapaan ioninvaihtajasta. Tuotetun aminohapon sisältävä vesipitoinen neste voidaan myös konsentroida ilman edelleenpuhdistusta, esimerkiksi membraanimenetelmällä tai konsentroimalla jäädyttämällä. Haluttaessa aminohappo voidaan lisäksi eristää puhtaassa muodossa konsentraatista, joka keksinnön mukaisella menetelmällä tuotetun aminohapon lisäksi sisältää myös lannan vesiliukoisia aineosia, joita ei kuluteta menetelmässä, kuten fosfaatteja sekä natrium-, kalium- ja kuparisuoloja. Tällaista aminohappoa voidaan sitten käyttää eläinrehun lisäaineena. Konsentraattia voidaan kuitenkin käyttää ilman lisäpuhdistusta eläinrehun lisäaineena, jolloin tarpeen vaatiessa ensin poistetaan toksiset aineet.

Kuparia esiintyy lannassa yleensä koska kuparisuoloja lisätään eläinrehuun kasvun edistäjäksi. Se ei itse varastoidu

M. A. A.

kehoon, mutta päätyy lantaan ja tavallisesti sen vuoksi ympäristöön. Seurauksena siitä, että konsentraattia käytetään eläinrehun lisäaineena, kupari tulee kierrätetyksi. Siten ei ole tarvetta, tai on vähemmän tarvetta lisätä kuparia rehuun ja ympäristöön leviää vähemmän kuparisaastetta.

Fosfaatti on eläinrehussa osittain fytiinin muodossa, joka on peräisin esimerkiksi soijasta. Kotieläimet eivät kykene riittävästi käyttämään fytiinissä olevaa fosfaattia. Vaikka ohutsuolessa fytiinistä vapautuva fosfaatti voi vielä absorboitua eläimeen, paksusuolessa fytiinistä vapautuva fosfaatti ei enää voi absorboitua, joten tämä fosfaatti yhdessä muuttumattoman fytiinin kanssa päätyy lantaan. Tällaisen fosfaatin ja muuttumattoman fytiinin kierrätys yllämainitun konsentraatin kautta voi myös johtaa ympäristön fosfaattisaastumisen vähenemiseen. Rehuun pitää siten lisätä vähemmän fosfaattia kuin nykyisissä ruokintamenetelmissä.

Fytaaasientsyymi voi muuttaa fytiinin fosfaatiksi, jonka eläin voi absorboida. Siten jos fosfaatti vapautuu fytaasin avulla lannassa olevasta fytiinistä ennen aminohappojen tuotantoa lannasta keksinnön mukaisella menetelmällä, aminohappojen tuotannon yhteydessä, tai sen jälkeen, ja tämä fosfaatti tulee kierrätetyksi, esimerkiksi yllämainitun konsentraatin kautta, ympäristön fosfaattisaastuminen vähenee edelleen. Keksinnön mukaisen menetelmä erityinen toteutusmuoto on siten sellainen, jossa fosfaatti vapautuu fytiinistä fytaasin avulla ennen välttämättömien aminohappojen tuotantoa lannasta, tuotannon aikana tai sen jälkeen, ja se tulee kierrätetyksi tässä muodossa muiden ravintoaineiden kanssa. Fytiinifosfaatin vapauttaminen tapahtuu mieluiten aminohappojen tuotannon aikana. Tätä tarkoitusta varten fytaasia lisätään reaktioseokseen ja tarkemmin sanottuna sellainen määrä, joka on riittävä hajottamaan fytiinin. Jos fermentoinnin aikana on läsnä mikro-organismi, joka tekee riittävästi fytaasia, lisäystä ei tarvitse suorittaa. Voi-

daan käyttää esimerkiksi sellaisia mikro-organismeja, jotka, sen jälkeen kun niihin on kloonattu tarvittavat geenit, kykenevät itse tuottamaan fytaasia. Yllämainittu konsentraatti, joka voidaan saada mainitun menetelmän lopputuloksena, sisältää tuotettujen aminohappojen lisäksi ei ainoastaan rehun lisäaineena käytettävää kuparia vaan myös fosfaattia täysin "vapautetussa" muodossa. Tällaisen konsentraatin käyttö eläinten rehun lisäaineena johtaa tuntuvaan vähenemiseen ympäristön typpi-, kupari- ja fosfaattisaastumisessa.

Jos lietteen vesifaasi konsentroidaan membraanimenetelmällä, esimerkiksi ultrasuodatuksen avulla, saadaan jätevettä, joka voidaan päästää suoraan yleiseen viemäriverkkoon.

Keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan edullisesti lämpötilassa 10-70 °C ja se suoritetaan mieluiten lämpötilassa 15-50 °C, 24-144 tunnin reaktioaika on tavallisesti riittävä.

Keksinnön mukaista menetelmää käyttäen on mahdollista valmistaa arvokasta eläinrehun lisäainetta hankalasta jäteaineesta. Kaikki se mitä jää jäljelle käytetystä puolimeste-mäisestä lannasta tuotetun aminohapon tai saadun konsentraatin lisäksi (suodatetut lannan aineosat, vesipitoiset liuokset) on paljon vähemmän ongelmallista kuin alkuperäinen puolimestemäinen lanta. Mainittuja kiinteitä jäännöksiä voidaan käyttää lannoitusaineena tai maanparannusaineena maataloudessa ja puutarhaviiljelmillä. Kuljetuskustannukset vähenevät pienemmän tilavuuden vuoksi. Ympäristösaasteiden, kuten fosfaatin, kuparin ja typen määrä on myös pienempi kuin alkuperäisessä lannassa, niin että mainitulla menetelmällä tuotetut, useammista sioista peräisin olevat kiinteät jätteet voidaan säilyttää maaseudulla pienemmässä tilassa tuotanto-toiminnan yhteydessä aiheuttamatta ympäristön ylikuormitusta. Jäljelle jäävät vesipitoiset liuokset voidaan usein päästää pois suoraan. Riippuen jälkikäsittelymenetelmistä ne

voidaan tarvittaessa edelleen käsitellä biologisessa puhdistamossa.

Tällä menetelmällä kyetään (jossain määrin käytetyistä mikro-organismeista riippuen) tuottamaan 0,5-15 g aminohappoa kilogrammaa kohti puolimestemäistä sian lantaa tai 0,2-8 g aminohappoa kilogrammaa kohti siitä saatua supernatanttia. Suurempia saantoja saadaan lisäämällä reaktiosekseen lisähiililähde. Vielä suurempia saantoja saadaan lisäämällä lantaa lisätyppilähde.

Keksintöä kuvataan seuraavilla esimerkeillä. Keksintöä ei ole kuitenkaan tarkoitus rajoittaa erityiseen toteutusmuotoon.

Esimerkki I: *Arthrobacter* SP B-1:tä (ATCC 21859), joka kykenee tuottamaan lyysiiniä, viljeltiin 24 tuntia 30 °C:ssa BHI:ssä (Difco) ja sillä ympättiin (2%:inen ymppi) 1,5 kg puolijuoksevan sian lannan supernatanttia, joka oli etukäteen steriloitu (45 min, 120 °C).

Supernatantin pelkistävien aineiden pitoisuus (ilmaistuna glukoosiyksiköinä) oli 1,2 g/kg, kokonaistyyppipitoisuus oli 2,7 g/kg ja ammoniumpitoisuus 2,1 g/kg.

Viljelmää ilmastettiin ja sekoitettiin. 144 tunnin kuluttua fermentointi lopetettiin ja reaktioseos jälkikäsiteltiin tavanomaisella tavalla. Solujäänteet poistettiin sentrifuugissa ja lyysiini eristettiin vesifaasista ioninvaihtajan avulla (Amberlite IR-120 H-muodossa). Saanto: 0,9 g lyysiiniä.

Esimerkki II: Esimerkki I toistettiin sillä erotuksella, että supernatanttiin lisättiin steriloinnin jälkeen 30 g glukoosia. Saanto: 4,2 g lyysiiniä.

Esimerkki III: 4 kg:a glukoosia vastaava määrä melassia lisättiin 100 kg:aan fermentorissa olevaa puolimestemäistä

sian lantaa. Puolinestemäinen lanta sisälsi 3,7 g pelkistävää ainetta, ilmaistuna glukoosiyksiköinä, 5,5 g kokonaistyppeä, 4,3 g ammoniumtyppeä, 4,2 g P_2O_5 :a ja 55 mg kuparia kg:aa kohti. Kun oli steriloitu pH:ssa 6 (1 tunti, 120 °C), fermentori ympätettiin 1 litralla Brevibacterium flavumia (ATCC 21475), joka kykenee tuottamaan lyysiiniä. pH säädettiin lisäämällä 2N H_2SO_4 :a tai 50%:ista w/w NaOH:a. B. flavum-viljelmä saatiin kasvattamalla kasvualustassa, joka sisälsi 10 g hiivauutetta litraa kohti ja 20 g glukoosia litraa kohti, 30 °C:ssa ja pH:ssa 7,5 24 tuntia. Fermentorissa olevaa seosta ilmastettiin ja sekoitettiin 72 tuntia 30 °C:ssa ja pH:ssa 7,5, jonka jälkeen fermentointi lopetettiin ja liete jälkikäsiteltiin. Kiinteät aineosat erotettiin vesifaasista sentrifuugissa. Vesifaasi konsentroitiin ultra-suodattamalla 10 litran tilavuuteen. Saatu konsentraatti, joka sisälsi 0,6 kg lyysiiniä, käytettiin eläinrehun lisäaineena.

Esimerkki IV: Esimerkki III toistettiin sillä erotuksella, että lähtöseokseen lisättiin myös 2,5 g fytaasia (Sigma, erä n:o 61F-8025). Saatiin konsentraatti, joka sisälsi 0,6 kg lyysiiniä, 0,15 kg "kulutettavissa olevaa" fosforia ja 510 mg kuparia. Kulutettavissa oleva fosfori lisättiin vapaina epäorgaanisina fosfaatteina.

Esimerkki V: Esimerkit I ja II toistettiin sillä erotuksella, että mikäli mikro-organismina käytettiin Corynebacterium glutamicumia (ATCC 21608), joka kykenee tuottamaan metioniinia, saatiin 0,5 ja vastaavasti 2,1 g metioniinia.

Patenttivaatimukset:

- (1.) Menetelmä aminohappojen, erityisesti L-aminohappojen, kuten L-lysiinin tai L-metioniinin valmistamiseksi ja uuttamiseksi lannasta, t u n n e t t u siitä, että kotieläinten lanta pastöroidaan tai steriloidaan ja sen jälkeen ympätään bakteereilla, jotka kykenevät tuottamaan mainittuja aminohappoja, bakteerien annetaan kasvaa lannassa ja reaktioseos jälkikäsitellään fermentoinnin jälkeen.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmä suoritetaan puolimestemäisellä sian lannalla.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmä suoritetaan puolimestemäisestä lannasta saadulla supernatantilla.
4. Patenttivaatimusten 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmä suoritetaan lämpötilassa 10-70 °C, mieluiten lämpötilassa 15-50 °C:ssa, 24-144 tunnin ajan.
5. Patenttivaatimusten 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puolimestemäiseen lantaan lisätään hiililähde, kuten melassia, glukoosia, sakkaroosia, sokerijuurikasmassaa tai jotain muuta sokeria sisältävää maatalousjätettä.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hiililähdettä lisätään vähemmän kuin 200 g glukoosiekvivalentteja kg:aa kohti lantaa, mieluiten vähemmän kuin 100 g glukoosiekvivalentteja kg:aa kohti lantaa.
7. Patenttivaatimusten 1-6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että L-lysiinin saanto fermentoinnin jälkeen on ainakin 1 g litraa kohti lantaa tai 0,5 g kg:aa kohti supernatanttia.

8. Patenttivaatimusten 1-6 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että L-metioniinin saanto fermentoinnin jälkeen
on ainakin 0,5 g kg:aa kohti tai 0,2 g kg:aa kohti superna-
tanttia.

9. Patenttivaatimusten 1-8 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että bakteereina käytetään "coryneform"-baktee-
rien ryhmään kuuluvia lajeja, joita ovat Arthrobacter, Bre-
vibacterium ja Corynebacterium.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että lajeina käytetään Brevibacterium flavumia,
Corynebacterium glutamicumia, Arthrobacter SP B-1:tä tai
niiden mutantteja tai variantteja.

11. Patenttivaatimusten 9-10 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että käytetään kantoja, joilla on seuraa-
vat talletusnumerot: ATCC 21475, ATCC 21608, ATCC 21859.

12. Patenttivaatimusten 1-11 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että reaktioseokseen lisätään fytaasi-
entsyymiä 10-50 mg kg:aa kohti lantaa.

13. Patenttivaatimusten 1-12 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että reaktioseos jälkikäsitellään erotta-
malla ensin kiinteät aineosat sentrifugoimalla tai suodatta-
malla ja sitten uuttamalla aminohappo vesifaasista tai suo-
doksesta ioninvaihtajan avulla.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että ioninvaihtajana käytetään voimakkaasti ha-
panta kationinvaihtajaa H-muodossa, josta aminohappo uute-
taan eluoimalla.

15. Patenttivaatimusten 1-14 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että reaktioseos jälkikäsitellään erotta-

malla ensin kiinteät aineosat sentrifugoimalla tai suodattamalla ja sitten konsentroimalla vesifaasi membraanimenetelmällä tai jäädyttämällä.

L17

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning och extraktion av aminosyror, speciellt L-aminosyror såsom L-lysin eller L-metionin ur dynga, k ä n n e t e c k n a t därav, att man pastöriserar eller steriliserar dyngan från husdjur och därefter ympar densamma med bakterier, som kan producera de nämnda aminosyrorna, låter bakterierna växa i dyngan och upparbetar reaktionsblandningen efter fermenteringen.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet utförs med halvflytande svindynga.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet utförs med en supernatant erhållen från halvflytande dynga.
4. Förfarande enligt patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet utförs i en temperatur mellan 10-70 °C, företrädesvis i en temperatur mellan 15-50 °C, under 24-144 timmar.
5. Förfarande enligt patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att man tillsätter^{K11} den halvflytande dyngan^{en} i en kolkälla, såsom melass, glukos, sackaros, sockerbetsmassa eller något annat lantbruksavfall som innehåller socker.
6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att man tillsätter kolkällan^{i en mängd på} mindre än

200 g glukosekvivalenter per kg dynga, helst mindre än 100 g glukosekvivalenter per kg dynga.

7. Förfarande enligt patentkraven 1-6, k ä n n e - t e c k n a t därav, att utbyte av L-lysin efter fermenteringen är åtminstone 1 g per en liter dynga eller 0,5 g per kg supernatant.

8. Förfarande enligt patentkraven 1-6, k ä n n e - t e c k n a t därav, att utbytet av L-metionin efter fermenteringen är åtminstone 0,5 g per kg eller 0,2 g per kg supernatant.

9. Förfarande enligt patentkraven 1-8, k ä n n e - t e c k n a t därav, att man använder som bakterier arter som tillhör gruppen "coryneform"-bakterierna, vilka arter är Arthrobacter, Brevibacterium och Corynebacterium.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e - t e c k n a t därav, att man använder som arter Brevibacterium flavum, Corynebacterium glutamicum, Arthrobacter SP B-1 eller mutanter eller varianter därav.

11. Förfarande enligt patentkraven 9-10, k ä n n e - t e c k n a t därav, att man använder stammar med följande depositionsnummer: ATCC 21475, ATCC 21608, ATCC 21859.

12. Förfarande enligt patentkraven 1-11, k ä n n e - t e c k n a t därav, att man tillsätter i reaktionsblandningen fytas-enzym 10-50 mg per kg dynga.

13. Förfarande enligt patentkraven 1-12, k ä n n e - t e c k n a t därav, att man upparbetar reaktionsblandningen genom att först åtskilja fasta komponenterna genom centrifugering eller filtrering och sedan genom att ex-

trahera aminosyran ur vattenfasen eller filtratet med hjälp av en jonbytare.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att man använder som jonbytare en
starkt sur katjonbytare i H-form, varifrån man extraherar
aminosyran genom att eluera.

15. Förfarande enligt patentkraven 1-14, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att man upparbetar reaktionsbland-
ningen genom att först åtskilja de fasta komponenterna
genom centrifugering eller filtrering och sedan genom att
koncentrera vattenfasen med membranmetoden eller genom
frysning.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE H-2 535 296 (C12D 13/06)

DK

FR

GB H-1 352 160 (B01F 3/04)

NO

SE

US	3 838 199	(A23K 1/00)
	3 973 043	(A23K 1/00)
	4 117 175	(A23F 3/00)
	4 292 328	(A23K 1/14)

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Abstracts 93(1980) 45 1122

22.3.95 Anna Lindholm
Allekirjoitus