



(10) **DE 603 18 133 T3** 2017.11.09

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 331 220 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 18 133.3**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 00 1551.5**

(96) Europäischer Anmeldetag: **23.01.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.07.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **19.12.2007**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **27.09.2017**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.11.2017**

(51) Int Cl.: **C07C 229/26** (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/175 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert.

(30) Unionspriorität:

2002017054 25.01.2002 JP

(73) Patentinhaber:

Ajinomoto Co., Inc., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:

**Strehl Schübel-Hopf & Partner mbB
Patentanwälte European Patent Attorneys, 80538
München, DE**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

**Morikawa, Junko, Kawasaki, Kanagawa, JP;
Kushiku, Takeshi, Kawasaki-shi, Kanagawa, JP;
Hasegawa, Kazuhiro, Yokkaichi-shi, Mie, JP**

(54) Bezeichnung: **Wasserfreies L-Lysin als Hauptbestandteil enthaltendes Granulat**

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines trockenen granulierten Produkts, das L-Lysin als Hauptbestandteil enthält. L-Lysin ist als Zusatzstoff für Tierfutter und dergleichen nützlich.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Da ein Zusatzstoff für Tierfutter, das eine Aminosäure als Hauptbestandteil enthält, nicht unbedingt stark gereinigt werden muss, wenn es als Zusatzstoff für Futtermittel eingesetzt wird, sind Versuche unternommen worden, einen solchen Zusatzstoff durch direktes Trocknen einer Fermentationslösung herzustellen, worin eine Aminosäure angehäuft ist (offengelegte Japanische Patentanmeldungen (Kokai) Nr. 59-169454 und 5-192089). In der offengelegten Japanischen Patentanmeldung Nr. 5-192089 wird betont, dass in Zusatzstoffen für Tierfutter, die auf eine solche Weise erhalten werden, der Gehalt an freien Aminosäuren in dem getrockneten Produkt, das eine basische Aminosäure als Hauptbestandteil enthält, im Vergleich zu einem trockenen Produkt, das eine neutrale Aminosäure als Hauptbestandteil enthält, stärker verringert ist. Es wird angenommen, dass dies zum Teil daran liegt, dass Anionen zu einer Kulturbrühe während der Kultivierung für die Produktion eines trockenen Produkts, das eine basische Aminosäure enthält, als Gegenionen der basischen Aminosäure zugegeben werden, um die Kulturbrühe elektrisch neutral zu halten, wobei die Anwesenheit der Anionen in dem Trockenprodukt zu einer Verringerung des Gehalts der Aminosäure führt. Dieses Problem wurde auch für L-Lysin beobachtet, die eine der basischen Aminosäuren ist.

[0003] Die Verwendung von Kristallen oder eines trockenen Produkts von L-Lysinbase, die überhaupt keine Gegenionen enthalten, als Zusatzstoff für Tierfuttermittel kann in Betracht gezogen werden, um den L-Lysingehalt in der Trockenmasse zu erhöhen. L-Lysinbase ist jedoch mit dem Problem behaftet, dass es deutliche hygroskopische Eigenschaften und Verbackungseigenschaften zeigt, so dass ihre Handhabung schwierig ist.

[0004] Als ein Verfahren zum Verbessern der hygroskopischen Eigenschaft und der Verbackungseigenschaft eines Trockenprodukts ist beispielsweise in der offengelegten Japanischen Patentanmeldung Nr. 9-28310 ein Verfahren vorgeschlagen worden, bei dem ein Antiverbackungsmittel zugegeben wird. Die Zugabe eines Antiverbackungsmittels führt jedoch zu einer Verringerung des Gehalts in dem Endprodukt und ist außerdem wirtschaftlich unvorteilhaft.

[0005] EP-A-1068804 offenbart trockene granuliert Lysinzusammensetzungen mit mehr als 70% Lysin, die einen typischen Feuchtigkeitsgehalt von 2 bis 3% haben. Die Zusammensetzungen werden durch ein Verfahren hergestellt, bei dem Schwefelsäure zu einer Fermentationsbrühe, die bei pH 7,5 kultiviert worden ist, gegeben wird und die Lösung dann auf einen Ionenaustauscher geladen wird, mit Ammoniak eluiert wird und schließlich die Zusammensetzung getrocknet wird.

[0006] EP-A-0923878 offenbart trockene Lysinzusammensetzungen mit einem Lysingehalt von 35 bis 80% mit einem Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 1%. Die Zusammensetzungen werden durch Fermentation, die bei einem pH von 7,1 kontrolliert wird, produziert, danach wird unter Vakuum getrocknet, und das erhaltene Konzentrat wird granuliert und getrocknet.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0007] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung eines getrockneten granulierten Produkts bereitzustellen, das L-Lysin enthält, wobei der L-Lysingehalt durch Verringern der Gegenionen in dem getrockneten L-Lysinprodukt erhöht ist und welches eine geringe hygroskopische Eigenschaft und Verbackungseigenschaft zeigt.

[0008] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um das vorstehend beschriebene Ziel zu erreichen. Als Ergebnis haben sie gefunden, dass ein trockenes granuliertes Produkt, das einen hohen L-Lysingehalt aufweist und geringe hygroskopische Eigenschaft und geringe Verbackungseigenschaft zeigt, erhalten werden kann, indem ein Äquivalentverhältnis von Anion/L-Lysin einer Fermentationslösung oder einer Lösung, die L-Lysin enthält und von einer Fermentationslösung erhalten worden ist, auf 0,68 bis 0,95 eingestellt wird, und die erhaltene Lösung dann granuliert und getrocknet wird. Die Erfin-

der der vorliegenden Erfindung haben außerdem gefunden, dass die Menge einer Quelle für Gegenionen, wie Sulfationen, verringert werden kann, indem während der Fermentation Kohlendioxid anstelle der Gegenionen erzeugt wird. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben auch gefunden, dass ein getrocknetes granuliertes Produkt mit einem hohen L-Lysingehalt und geringer hygroskopischer Eigenschaft und geringer Verbackungseigenschaft auch durch Einsatz des vorstehend beschriebenen Verfahrens erhalten werden kann. Die vorliegende Erfindung wurde auf der Grundlage dieser Ergebnisse gemacht und stellt Folgendes bereit.

(1) Ein Verfahren zum Herstellen eines trockenen granulierten Produkts das L-Lysin enthält und die folgende Zusammensetzung aufweist:

L-Lysingehalt in der Trockenmasse: 40 bis 85 Gew.-%

Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin: 0,68 bis 0,95

Feuchtigkeitsgehalt: 5 Gew.-% oder weniger,

worin das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin ein Wert ist, der nach der folgenden Gleichung unter Einsetzen des L-Lysin(L-Lys)-Gehalts, des Sulfationengehalts, des Chloridionengehalts, des Ammoniumionengehalts, des Natriumionengehalts, des Kaliumionengehalts, des Magnesiumionengehalts und des Calciumionengehalts in der Trockenmasse des getrockneten granulierten Produkts berechnet wird:

$$\text{Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin} = (2 \times [\text{SO}_4^{2-}] + [\text{Cl}^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{Na}^+] - [\text{K}^+] - 2 \times [\text{Mg}^{2+}] - 2 \times [\text{Ca}^{2+}]) / [\text{L-Lys}]$$

worin [] eine Molkonzentration bedeutet,

wobei das Verfahren die Stufen umfasst, bei denen Chlorwasserstoffsäure oder Schwefelsäure zu einer Ausgangsmaterial-L-Lysinlösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von weniger als 0,68 gegeben wird, um das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin der Ausgangsmateriallösung auf einen Bereich von 0,68 bis 0,95 einzustellen, und das getrocknete granuliert Produkt aus der erhaltenen L-Lysinlösung oder einem Konzentrat davon erhalten wird.

(2) Das Verfahren nach (1), wobei die Ausgangsmaterial-L-Lysinlösung dadurch erhalten wird, dass eine L-Lysin enthaltende wässrige Lösung auf ein Kationenaustauscherharz zur Adsorption des L-Lysins an das Harz aufgetragen wird und das an das Harz adsorbierte L-Lysin mit wässrigem Ammoniak, wässriger Ammoniumchloridlösung oder beiden eluiert wird.

(3) Verfahren zum Herstellen eines getrockneten granulierten Produkts, das L-Lysin enthält, welches die Stufen umfasst, bei denen ein Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin in einem Medium unter einer aeroben Bedingung kultiviert wird, wobei L-Lysin in dem Medium hergestellt und angehäuft wird, und das getrocknete Produkt aus dem Medium erhalten wird,

wobei die Kultivierung durchgeführt wird, um eine L-Lysin enthaltende Fermentationslösung zu erhalten, während der pH-Wert des Mediums während der Kultivierung auf 6,5 bis 9,0 kontrolliert wird und am Ende der Kultivierung auf 7,2 bis 9,0 kontrolliert wird, wobei der Druck in dem Fermentationsbehälter während der Kultivierung auf einen positiven Wert kontrolliert wird, oder Kohlendioxid oder ein Kohlendioxid enthaltendes Mischgas in das Medium gegeben wird, so dass sich eine Kultivierungsperiode ergeben sollte, in der Bicarbonat- und/oder Carbonationen in dem Medium in einer Menge von 2 g/L oder mehr enthalten sind, bei Bedarf Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure oder eine L-Lysinlösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von mehr als 0,95 zu der Fermentationslösung gegeben wird, so dass die Fermentationslösung ein Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin im Bereich von 0,68 bis 0,95 haben sollte, und die Fermentationslösung unter vermindertem Druck konzentriert wird, und das erhaltene Konzentrat granuliert und getrocknet wird, wobei ein trocknes Granulatprodukt erhalten wird, das L-Lysin enthält und die folgende Zusammensetzung aufweist:

L-Lysingehalt in der Trockenmasse: 40 bis 85 Gew.-%

Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin: 0,68 bis 0,95

Feuchtigkeitsgehalt: 5 Gew.-% oder weniger,

worin das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin ein Wert ist, der nach der folgenden Gleichung unter Einsetzen des L-Lysin(L-Lys)-Gehalts, des Sulfationengehalts, des Chloridionengehalts, des Ammoniumionengehalts, des Natriumionengehalts, des Kaliumionengehalts, des Magnesiumionengehalts und des Calciumionengehalts in der Trockenmasse des getrockneten granulierten Produkts berechnet wird:

$$\text{Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin} = (2 \times [\text{SO}_4^{2-}] + [\text{Cl}^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{Na}^+] - [\text{K}^+] - 2 \times [\text{Mg}^{2+}] - 2 \times [\text{Ca}^{2+}]) / [\text{L-Lys}]$$

worin [] eine Molkonzentration bedeutet.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung

[0009] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung eingehend erklärt.

[0010] Das durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltene trockene granuliert Produkt, das L-Lysin enthält, hat die folgende Zusammensetzung.

- (1) L-Lysingehalt in der Trockenmasse: 40 bis 85 Gew.-%
- (2) Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin: 0,68 bis 0,95
- (3) Feuchtigkeitsgehalt: 5 Gew.-% oder weniger.

[0011] Herkömmliche trockene granuliert Produkte, die L-Lysin als Hauptbestandteil enthalten, sind mit dem Problem behaftet, dass der Gehalt an freiem L-Lysin verringert wird. Andererseits ist eine der Eigenschaften des erfindungsgemäßen trockenen granulierten Produkts, dass der Gehalt an freiem Lysin hoch ist, während ein hoher L-Lysingehalt aufrechterhalten wird, weil eine überschüssige Menge von Anionen als Gegenionen von L-Lysin abwesend ist. Der L-Lysingehalt des erfindungsgemäßen trockenen granulierten Produkts ist 40 bis 85%, vorzugsweise 50 bis 85%, stärker bevorzugt 60 bis 85 Gew.-%, bezogen auf den Feststoffgehalt in dem trockenen granulierten Produkt. Ein solcher L-Lysingehalt kann erhalten werden, indem eine L-Lysinlösung granuliert und getrocknet wird, nachdem das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin der nachstehend beschriebenen L-Lysinlösung auf einen vorbestimmten Wert eingestellt wird.

[0012] Ein trockenes granuliertes Produkt, das L-Lysin in einer Menge im vorstehend definierten Bereich enthält, wird erhalten, indem das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin einer L-Lysinfermentationslösung oder einer Ausgangsmaterial-L-Lysinlösung, die von der L-Lysin-Fermentationslösung gewonnen wurde, auf 0,68 bis 0,95, vorzugsweise 0,68 bis 0,90, stärker bevorzugt 0,68 bis 0,86 eingestellt wird und von der erhaltenen L-Lysinlösung oder einem Konzentrat davon ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wird.

[0013] In der vorliegenden Erfindung bedeutet das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin einen Wert, der gemäß der folgenden Gleichung unter Verwendung des L-Lysin(L-Lys)-gehalts, des Sulfationengehalts, des Chloridionengehalts, des Ammoniumionengehalts, Natriumionengehalts, Kaliumionengehalts, Magnesiumionengehalts und Calciumionengehalts in der Trockenmasse des trockenen granulierten Produkts berechnet wird:

$$\text{Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin} = (2 \times [\text{SO}_4^{2-}] + [\text{Cl}^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{Na}^+] - [\text{K}^+] - 2 \times [\text{Mg}^{2+}] - 2 \times [\text{Ca}^{2+}]) / [\text{L-Lys}]$$

worin [] eine Molkonzentration bedeutet.

[0014] Um das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf einen Wert innerhalb des vorstehend beschriebenen Bereichs einzustellen, wird Chlorwasserstoffsäure oder Schwefelsäure zu der Ausgangsmaterial L-Lysinlösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von niedriger als 0,68 gegeben.

[0015] Genauer gesagt kann ein Verfahren zum Neutralisieren einer Lösung einer L-Lysinbase mit einer Säure und ein Verfahren unter Einsatz von Carbonat als Gegenionen von L-Lysin während der Produktion von L-Lysin durch Fermentation, anschließendes Granulieren und Trocknen einer decarboxylierten Fermentationslösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von unter 0,95 genannt werden.

[0016] Die L-Lysinlösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von mehr als 0,95, bedeutet hier eine L-Lysinlösung mit einem pH-Wert im neutralen bis sauren Bereich, und es kann beispielsweise eine Fermentationslösung, die L-Lysin enthält und die durch ein übliches Fermentationsverfahren erhalten wurde, eingesetzt werden. Eine solche L-Lysin-Fermentationslösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von höher als 0,95 ist nicht geeignet, um ein trockenes granuliertes Produkt mit einem hohen L-Lysingehalt zu erhalten. Wenn andererseits eine L-Lysinlösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von niedriger als 0,68 als solches granuliert und getrocknet wird, zeigt das Produkt eine deutliche hygroskopische Eigenschaft und Verbackungseigenschaft, so dass ihre Handhabung schwierig wird. Wenn jedoch das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin einer solchen Lösung innerhalb eines Bereichs von 0,68 bis 0,95 eingestellt wird, indem es gemäß Anspruch 3 mit einer L-Lysin-Fermentationslösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von höher als 0,95 gemischt wird und die Lösung dann granuliert und getrocknet wird, kann ein trockenes granuliertes Produkt mit geringer Verbackungseigenschaft und hygroskopischer Eigenschaft erhalten werden.

[0017] Um das trockene granuliert Produkt durch ein Verfahren zu erhalten, bei dem eine Lösung einer L-Lysinbase mit einer Säure neutralisiert wird, kann das folgende Verfahren eingesetzt werden.

[0018] Eine anorganische Säure, beispielsweise Chlorwasserstoffsäure oder Schwefelsäure, wird zu einer Ausgangsmateriallösung einer L-Lysinbase gegeben, um eine Lösung herzustellen, deren Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf 0,68 bis 0,95 eingestellt wird. Dann kann die Lösung nach der Konzentration oder als solche granuliert und getrocknet werden, um das erfindungsgemäße trockene granuliert Produkt zu erhalten.

[0019] Als die in diesem Fall eingesetzte Ausgangsmateriallösung einer L-Lysinbase kann eine Lösung eingesetzt werden, die durch Auftragen einer L-Lysinlösung, die durch Fermentation, chemische Synthese und dergleichen hergestellt wurde, auf ein Kationen-Austauscher-Harz, wobei L-Lysin an das Harz adsorbiert, und durch anschließendes Eluieren mit wässrigem Ammoniak und Konzentrieren der erhaltenen L-Lysinlösung unter vermindertem Druck zur Entfernung von Ammoniak erhalten werden.

[0020] Als Verfahren zum Produzieren von L-Lysin durch Fermentation wird ein Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin in einem Fermentationsmedium, das mindestens eine Art einer Kohlenstoffquelle, mindestens eine Art einer Stickstoffquelle, Mineralsalze, Aminosäure, Vitamine, Spuren Mengen von Metallelementen und dergleichen enthält, kultiviert. Während der Fermentation wird der pH-Wert im neutralen Bereich gehalten, es wird ausreichend gerührt und ausreichend Sauerstoff zugegeben.

[0021] Durch Reinigen von L-Lysin unter Verwendung eines Kationen-Austauscher-Harzes aus der wie vorstehend beschrieben erhaltenen Fermentationslösung kann eine L-Lysinlösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von unter 0,68 erhalten werden.

[0022] Der Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin ist nicht besonders eingeschränkt, so dass jeder beliebige Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin eingesetzt werden kann. Während Beispiele des eingesetzten Mikroorganismus Coryneforme Bakterien und Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Serratia* oder *Bacillus* umfassen, sind die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzten Bakterien nicht auf diese Bakterien beschränkt.

[0023] Spezifische Beispiele von *Escherichia coli*-Stämmen mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin umfassen *Escherichia coli* W3110(*tyrA*)/pCABD2 (beschrieben in der internationalen Patentanmeldung WO95/16042) und dergleichen. Der Stamm *Escherichia coli* W3110(*tyrA*)/pCABD2 ist ein Stamm, der durch Einführen des Plasmids pCABD2, das Gene enthält, die für Enzyme des L-Lysin-Biosyntheseweges kodieren, in W3110(*tyrA*), der ein *tyrA*-defizienter Stamm von *Escherichia coli* ist, erhalten wird (dieser Stamm wurde als AJ12604 bezeichnet und am 28. Januar 1991 beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (derzeit die unabhängige Verwaltungseinrichtung National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (Adresse: Postleitzahl 305-8566, Chuo Dai-6, 1-1 Higashi 1-Chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, Japan) unter der Hinterlegungsnummer FERM P-11975 hinterlegt und dann unter den Bestimmungen des Budapester Abkommens am 29. Oktober 1987 unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-3579) in eine internationale Hinterlegung umgewandelt).

[0024] Das Plasmid pCABD2 enthält ein Gen, das für eine mutierte Dihydrodipicolinat-Synthase kodiert, deren Histidinrest an der Position 118 zu einem Tyrosinrest mutiert ist und deren Rückkopplungshemmung durch L-Lysin ausgeschaltet ist, ein Gen, das für eine mutierte Aspartokinase III kodiert, deren Threoninrest an der Position 352 zu einem Isoleucinrest mutiert ist und deren Rückkopplungshemmung durch L-Lysin ausgeschaltet ist, und Gene, die für Dihydrodipicolinatreductase und Diaminpimelatdehydrogenase kodieren.

[0025] Außerdem kann der Stamm *E. coli* W3110(*tyrA*) wie nachstehend beschrieben erhalten werden. Viele Stämme, die durch Einführen eines Plasmids in den Stamm W3110(*tyrA*) erhalten werden, sind in der offengelegten europäischen Patentanmeldung Nr. 488424/1992 offenbart. Beispielsweise wird ein Stamm, der durch Einführen des Plasmids pHATerm erhalten wird, als *E. coli* W3110(*tyrA*)/pHATerm bezeichnet und ist beim National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-3653 hinterlegt. Der Stamm W3110(*tyrA*) kann durch Eliminieren des Plasmids pHATerm aus dem Stamm *E. coli* W3110(*tyrA*)/pHATerm erhalten werden. Die Eliminierung des Plasmids kann auf herkömmliche Weise durchgeführt werden.

[0026] Beispiele von L-Lysin produzierenden Bakterien der Gattung *Serratia* umfassen Bakterien der Gattung *Serratia*, die durch Einführen einer DNA, die für Dehydrodipicolinat-Synthase mit einer Mutation kodiert, welche die Rückkopplungshemmung durch L-Lysin ausschaltet, in die Zellen transformiert worden ist, und Bakterien der Gattung *Serratia*, die Aspartokinase enthält, deren Rückkopplungshemmung durch L-Lysin ausgeschaltet ist (internationale Patentveröffentlichung WO96/41871).

[0027] In der vorliegenden Erfindung kann als Verfahren zum Herstellen des trockenen granulierten Produkts ein übliches Verfahren zum Herstellen eines trockenen granulierten Produkts, das eine L-Aminosäure enthält, ohne besondere Einschränkung verwendet werden. Beispiele des Verfahrens zum Granulationstrocknen umfassen ein Verfahren, bei dem zuerst die vorstehend beschriebene L-Lysinlösung verfestigt wird und das verfestigte Produkt granuliert wird, ein Verfahren zum direkten Granulieren und Trocknen der Lösung unter Verwendung eines Granulationskeims und dergleichen.

[0028] In dem erstgenannten Verfahren kann als Verfahren zum Verfestigen der L-Lysinlösung ein Verfahren zum Trocknen und Verfestigen unter Verwendung eines Sprühtrockners, Trommeltrockners, eines Wirbelschnelltrockners oder dergleichen eingesetzt werden. Der erhaltene Feststoff, der L-Lysin enthält, kann unter Einsatz verschiedener Granulatoren, beispielsweise eines Granulationsmischers, Vorrichtungen für die Fließbettgranulation, Walzengranulation und dergleichen, granuliert werden. Wenn in diesem Fall die L-Lysinlösung mit einem regulierten Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin als Bindemittel für die Granulation eingesetzt wird, kann die Granulation auf einfache Weise erzielt werden.

[0029] Andererseits kann als Verfahren zum direkten Granulieren und Trocknen einer L-Lysinlösung unter Verwendung von Keimteilchen ein Verfahren eingesetzt werden, bei dem eine L-Lysinlösung direkt getrocknet und granuliert wird, wobei das vorstehend genannte L-Lysin enthaltende granuliert Produkt als Keimteilchen in der Fließbettgranulation eingesetzt wird und die L-Lysinlösung in das Bett gesprüht wird. Als Keimteilchen kann das vorstehend beschriebene L-Lysin enthaltende granuliert Produkt eingesetzt werden, und es kann beispielsweise ein Teil des durch die Fließbettgranulation erhaltenen Produkts gemahlen und als Keimteilchen eingesetzt werden.

[0030] Beide Verfahren werden ausgeführt, so dass der Feuchtigkeitsgehalt in dem erhaltenen getrockneten granulierten Produkt 5 Gew.-% oder weniger werden sollte.

[0031] Nachdem die Ausgangsmaterial-L-Lysinlösung durch Fermentation hergestellt worden ist, wird das trockene granuliert Produkt wie folgt erhalten, wenn das Verfahren des Zugebens einer Lösung einer L-Lysinbase mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von unter 0,95 eingesetzt wird. Zuerst wird die vorstehend beschriebene Lösung einer L-Lysinbase zu einer Fermentationslösung gegeben, worin L-Lysin angehäuft ist, um eine Lösung mit einer solchen Zusammensetzung zu erhalten, dass die Lösung ein vorbestimmtes Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin aufweisen sollte. Die Lösung kann nach der Konzentration granuliert und getrocknet werden, oder die Lösung kann als solche direkt granuliert und getrocknet werden, wobei das erfindungsgemäße trockene granuliert Produkt erhalten wird.

[0032] Für die Produktion einer Lösung einer L-Lysinbase mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von unter 0,95 durch Fermentation kann das vorstehend beschriebene Verfahren zum Herstellen von L-Lysin durch Fermentation genannt werden.

[0033] Bei der Produktion des trockenen granulierten Produkts ist es, obwohl Zellen in der Kulturbrühe entfernt werden können oder nicht entfernt werden können, stärker vorteilhaft, dass die Zellen entfernt werden, da das Entfernen der Zellen den L-Lysingehalt in dem trockenen granulierten Produkt erhöht. Als Verfahren zum Entfernen von Zellen aus der Kulturbrühe kann Zentrifugation, Filtration, Ausfällung und dergleichen eingesetzt werden.

[0034] Als Verfahren zu dem in diesem Verfahren eingesetzten Granulationstrocknen können auch die vorstehend beschriebenen Granulationstrocknungsverfahren eingesetzt werden.

[0035] Wenn das Verfahren unter Verwendung von Carbonat für Gegenionen von L-Lysin während der Produktion von L-Lysin durch Fermentation und anschließende Decarboxylierung eingesetzt wird, wird das trockene granuliert Produkt beispielsweise wie folgt erhalten.

[0036] Die Fermentation, bei der ein Stamm mit einer Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin in einem Medium unter aeroben Bedingungen kultiviert wird, wird unter Verwendung von Carbonationen oder Bicarbonationen als Hauptgegenionen von L-Lysin durchgeführt, und die erhaltene Fermentationslösung wird als Ausgangsmaterial eingesetzt und einer Decarboxylierung unterworfen, wobei eine L-Lysinlösung mit einem verringerten Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin erhalten wird. Unter bevorzugten Bedingungen sollte die wie vorstehend beschrieben erhaltene L-Lysinlösung ein Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin im Bereich von 0,68 bis 0,95 haben. Wenn das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin unter diesem Bereich liegt, wird Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure oder eine L-Lysinlösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von über 0,95 gemäß

Anspruch 3 bei Bedarf zugegeben, um das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf einen Wert innerhalb des vorbestimmten Bereichs einzustellen.

[0037] In dem vorstehend beschriebenen Verfahren ist der Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin nicht besonders eingeschränkt, so dass ein beliebiger Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin eingesetzt werden kann. Beispielsweise können die vorstehend beschriebenen Mikroorganismen genannt werden.

[0038] Wenn ein Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin in einem Medium unter aeroben Bedingungen in dem erfindungsgemäßen Verfahren kultiviert wird, können Carbonationen, Bicarbonationen oder beide Ionen als Hauptgegenionen von L-Lysin beispielsweise wie folgt eingesetzt werden.

[0039] Der pH-Wert des Mediums wird auf 6,5 bis 9,5, vorzugsweise 6,5 bis 8,0 während der Kultivierung und auf 7,2 bis 9,0 am Ende der Kultivierung reguliert. Alternativ dazu wird der Druck in einem Fermentationsbehälter während der Kultivierung so reguliert, dass er positiv ist, oder Kohlendioxid oder ein Kohlendioxid enthaltendes Mischgas wird in das Medium gegeben, so dass es eine Kulturperiode geben sollte, bei der Bicarbonat- und/oder Carbonationen in dem Medium in einer Menge von 2 g/l oder höher enthalten sind. Der Ausdruck "es sollte eine Kulturperiode geben, bei der Bicarbonat- und/oder Carbonationen in dem Medium in einer Menge von 2 g/l oder höher enthalten sind" bedeutet hier nicht unbedingt, dass 2 g/l oder mehr Ionen während der gesamten Kulturperiode vorhanden sein müssen, sondern bedeutet, dass es ausreicht, dass 2 g/l oder mehr Gegenionen während einer bestimmten Teildauer während der Kulturdauer vorhanden sind. Die Dauer, während der Ionen in einer Menge von 2 g/l oder mehr vorhanden sind, ist vorzugsweise innerhalb des Zeitraums von der logarithmischen Wachstumsphase bis zu der stationären Phase.

[0040] Wenn in der vorliegenden Erfindung der regulierte pH-Wert erhöht wird, wird das Gleichgewicht verändert, so dass das einwertige Anion in der Kulturbrühe, HCO_3^- , in das zweiwertige Anion, CO_3^{2-} , umgewandelt werden sollte, so dass das Ion als Gegenion effektiver wird. Wenn der pH-Wert außerdem mit Ammoniak reguliert wird, führt eine Erhöhung des pH-Werts zu einer Zuführung von Ammoniak, welches dann als Stickstoffquelle für die L-Lysinfermentation eingesetzt werden kann. Als andere Kationen als L-Lysin können K, Na, Mg, Ca und dergleichen, die von Mediumbestandteilen abgeleitet sind, genannt werden. Diese Kationen machen 50% oder weniger der gesamten Kationen aus.

[0041] Um einen positiven Druck im Fermentationsbehälter während der Fermentation zu erhalten, kann beispielsweise ein Einlassgasdruck eingesetzt werden, der höher ist als der Auslassgasdruck. Durch Einstellen eines positiven Drucks in dem Fermentationsbehälter wird das durch die Fermentation erzeugte Kohlendioxid in der Kulturbrühe aufgelöst, wobei Bicarbonat- oder Carbonationen erhalten werden, die als Gegenionen von L-Lysin dienen können. Der Druck in dem Fermentationsbehälter ist 0,03 bis 0,2 MPa, vorzugsweise 0,03 bis 0,2 MPa, vorzugsweise 0,05 bis 0,15 MPa.

[0042] Außerdem kann Kohlendioxid in der Kulturbrühe aufgelöst werden, indem Kohlendioxid oder ein Kohlendioxid enthaltendes Mischgas in die Kulturbrühe gegeben wird. Außerdem kann der Druck in dem Fermentationsbehälter so reguliert werden, dass er positiv ist, während Kohlendioxid oder ein Kohlendioxid enthaltendes Mischgas in die Kulturbrühe gegeben wird.

[0043] Um den Druck in dem Fermentationsbehälter positiv zu halten, kann beispielsweise ein Einlassgasdruck eingesetzt werden, der höher ist als der Auslassgasdruck. Wenn Kohlendioxid in die Kulturbrühe gegeben wird, kann beispielsweise Kohlendioxid oder ein Mischgas, das 5 Volumen-% oder mehr Kohlendioxid enthält, in die Kulturbrühe eingeblasen werden.

[0044] Das für die Kultivierung eingesetzte flüssige Medium ist nicht besonders eingeschränkt, und herkömmlich bekannte Medien, die organische und anorganische Nährstoffe enthalten, wie eine Kohlenstoffquelle und eine Stickstoffquelle sowie Spuren Mengen von Nährstoffen, können in Abhängigkeit von dem eingesetzten Mikroorganismus in geeigneter Weise verwendet werden. Die Kohlenstoffquelle kann eine beliebige Kohlenstoffquelle sein, die von dem Mikroorganismus assimiliert werden kann. Beispiele davon umfassen Saccharide, wie Saccharose, Glucose, Fructose, Melasse und Stärkehydrolysat, organische Säuren, wie Essigsäure und Alkohole, wie Ethanol und Methanol. Beispiele der Stickstoffquelle umfassen anorganische Substanzen, wie Ammoniumionen, Proteinhydrolysat und Hefeextrakt. Beispiele der Spurenelemente umfassen Aminosäure, Vitamine und Spuren von Metallelementen.

[0045] Das Fermentationsschema ist ebenfalls nicht besonders eingeschränkt, so dass eine Chargenkultur, bei der Medium nicht zusätzlich eingespeist wird, eine Einspeisungskultur, bei der Medium eingespeist wird, wenn das ursprünglich zugegebene Saccharid verbraucht ist, und eine kontinuierliche Kultur eingesetzt werden, bei der Medium extrahiert wird, wenn das Volumen des Mediums die Kapazität des Fermentationsbehälters übersteigt.

[0046] Obwohl die Kultivierungstemperatur in geeigneter Weise in Abhängigkeit von dem eingesetzten Mikroorganismus ausgewählt werden kann, ist sie üblicherweise 25 bis 45°C, vorzugsweise 30 bis 40°C. Außerdem wird während der Fermentation ausreichend gerührt und ausreichend Sauerstoff zugeführt.

[0047] In den herkömmlichen Verfahren werden üblicherweise eine ausreichende Menge Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Schwefelsäure-Zersetzungsprodukte oder Chlorwasserstoffsäure-Zersetzungsprodukte von Proteinen und dergleichen zu dem Medium gegeben, um das hergestellte L-Lysin als Gegenionen zu verwenden, und die durch diese Substanzen bereitgestellten Sulfationen und Chloridionen sind in dem Medium enthalten. Deshalb wird die Konzentration von schwachsauren Carbonationen während der Kultivierung mit einer Größenordnung von ppm extrem gering. Die vorliegende Erfindung ist jedoch dadurch gekennzeichnet, dass diese Sulfationen und Chloridionen verringert werden, so dass das von dem Mikroorganismus während der Fermentation ausgeschiedene Kohlendioxid in dem Medium aufgelöst werden sollte, wobei Gegenionen gebildet werden. Deshalb ist es in der vorliegenden Erfindung nicht erforderlich, Sulfationen oder Chloridionen zuzugeben, welche die für das Wachstum des Mikroorganismus erforderliche Menge übersteigen. Vorzugsweise wird eine optimale Menge Ammoniumsulfat oder dergleichen während eines frühen Stadiums der Kultivierung zu dem Medium gegeben, und die Zugabe wird im Verlauf der Kultivierung beendet. Alternativ dazu kann Ammoniumsulfat oder dergleichen zugegeben werden, während das Gleichgewicht mit der Menge der Carbonationen oder Bicarbonationen, die in dem Medium enthalten sind, aufrechterhalten wird. Außerdem kann Ammoniak als Stickstoffquelle von L-Lysin zu dem Medium gegeben werden.

[0048] Wenn Ammoniumsulfat als Quelle für Gegenionen von L-Lysin zu dem Medium gegeben wird, wird Kohlendioxid in der Kulturbrühe üblicherweise durch Sulfationen eliminiert. Im Gegensatz dazu muss in der vorliegenden Erfindung eine überschüssige Menge Ammoniumsulfat nicht zu dem Medium gegeben werden, und deshalb kann Kohlendioxid in der Fermentationslösung leicht aufgelöst werden.

[0049] Die durch die vorliegende Erfindung erhaltene Fermentationslösung, die L-Lysin enthält, enthält 5 bis 80% Carbonationen oder Bicarbonationen, bezogen auf die Normalität des durch die Fermentation produzierten L-Lysins. Diese Carbonationen oder Bicarbonationen werden als Kohlendioxid leicht eliminiert, wenn erwärmt wird, die Kulturbrühe unter verminderten Druck gesetzt wird oder die Kulturbrühe unter vermindertem Druck erwärmt wird. Als Ergebnis wird der Gehalt an Lysin in der Trockenmasse der Fermentationslösung erhöht. Die Erwärmungstemperatur kann 40°C oder mehr, vorzugsweise 60°C bis 90°C sein. Der verringerte Druck kann 600 kPa oder weniger, vorzugsweise 0,04 MPa bis 0,2 MPa sein.

[0050] Dies führt zu einer Verringerung des Äquivalentverhältnisses Anion/L-Lysin in der Kulturbrühe auf 0,20 bis 0,95. Diese verbleibenden Gegenionen bestehen aus Sulfationen und Chloridionen, die zu dem Medium gegeben werden.

[0051] Dann wird das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf 0,68 bis 0,95 eingestellt, indem eine anorganische Säure, wie Chlorwasserstoffsäure und Schwefelsäure, oder eine L-Lysinlösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von mehr als 0,95 zugegeben wird.

[0052] Nachdem das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin eingestellt ist, kann die L-Lysinlösung granuliert und getrocknet werden, wobei ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wird. Auch bei diesem Granulationstrocknungsverfahren können die vorstehend beschriebenen Granulationstrocknungsverfahren eingesetzt werden.

[0053] Erfindungsgemäße kann ein L-Lysin enthaltendes trockenes granuliertes Produkt erhalten werden, das L-Lysin in einer höheren Konzentration enthält und vorteilhafte hygroskopische Eigenschaften und Verbackungseigenschaften aufweist.

Beispiele

[0054] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand der folgenden Beispiele eingehender erklärt.

Beispiel 1

[0055] Das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin einer Ausgangsmateriallösung einer L-Lysinbase wurde unter Verwendung von Schwefelsäure eingestellt, und es wurde ein trockenes granuliertes Produkt hergestellt.

[0056] Die Fermentation wurde unter Verwendung eines L-Lysin produzierenden Bakteriums Escherichia coli W3110(tyrA)/pCABD2 (internationale Patentveröffentlichung WO95/16042) in einem Medium der folgenden Zusammensetzung durchgeführt.

[0057] Glucose 100 g/, Ammoniumsulfat 60 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8,1 mg/l, Biotin 300 µg/l, Thiaminhydrochlorid 200 µg/l, Sojabohnenproteinhydrolysat (Gesamtstickstoffgehalt: 3,2%) 35 ml/l, L-Methionin 200 mg/l, Calciumcarbonat 50 g/l, pH 7,0.

[0058] Der L-Lysin produzierende Stamm wurde in das vorstehend genannte Medium eingimpft und 72 Stunden bei 36°C kultiviert.

[0059] Nach vollständigem Ablauf der Kultivierung wurden 10 l L-Lysin enthaltende Kulturbrühe erhalten.

[0060] Die Kulturbrühe wurde durch Zugabe von Schwefelsäure auf pH 3,0 eingestellt und dann auf das Kationen-Austauscherharz DIAION SK1BL (Mitsubishi Chemical) geladen, so dass L-Lysin an das Harz adsorbiert wurde. Nach der Adsorption von L-Lysin wurde das Harz mit Wasser gewaschen, und L-Lysin wurde mit wässrigem Ammoniak eluiert. Das L-Lysin enthaltende Eluat wurde dann in einem Rotationsverdampfer konzentriert, bis die L-Lysin-Konzentration 50 Gew.-% wurde, wobei eine Lösung einer L-Lysinbase erhalten wurde.

[0061] Dann wurde Schwefelsäure (98%, spezieller Reinheitsgrad) zu der Lösung der L-Lysinbase gegeben, um das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf 0,6984 einzustellen. Auf diese Weise wurde eine Einspeisungslösung für die Granulationstrocknung erhalten.

[0062] Ein Teil der Einspeisungslösung für die Granulationstrocknung in einem Volumen von 1 l wurde unter Verwendung eines Sprühtrockners (Pulvis GB22, Yamato Scientific) getrocknet, wobei ein Pulver erhalten wurde. Das erhaltene Pulver als Keimteilchen und die verbleibende Einspeisungslösung für die Granulationstrocknung, die nicht für die Trocknung in dem Sprühtrockner eingesetzt worden war, als Bindemittellösung wurden in einen Granulationstrockner (SPIR-A-FLOW, Freund) eingespeist, und das Granulationstrocknen wurde durchgeführt, wobei ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wurde.

Beispiel 2

[0063] Das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin einer Ausgangsmateriallösung einer L-Lysinbase wurde unter Einsatz von Chlorwasserstoffsäure eingestellt und es wurde ein getrocknetes granuliertes Produkt hergestellt.

[0064] Chlorwasserstoffsäure (36%, spezieller Reinheitsgrad) wurde zu einer auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 erhaltenen Lösung einer L-Lysinbase gegeben, um das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf 0,6903 einzustellen. Dann wurde das Granulationstrocknen auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 durchgeführt, wobei ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wurde.

Vergleichsbeispiel 1

[0065] Das Granulationstrocknen wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 unter Verwendung einer Lösung einer L-Lysinbase, die auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 erhalten wurde, als Ausgangsmaterial ohne Einstellen des Äquivalentverhältnisses Anion/L-Lysin durchgeführt, wobei ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wurde.

Vergleichsbeispiel 2

[0066] Schwefelsäure wurde zu einer auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 erhaltenen Lösung einer L-Lysinbase gegeben, wobei das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf 0,9622 eingestellt wurde. Dann wurde das Granulationstrocknen auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 durchgeführt, wobei ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wurde.

[0067] Der L-Lysingehalt und der Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalt der erhaltenen trockenen granulierten Produkte wurden gemessen, und die Produkte wurden hinsichtlich ihrer Verbackungseigenschaften beurteilt.

[0068] Für die Messung des Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalts wurde der Feuchtigkeitsgehalt jedes Produkts nach der Lagerung in Umgebungen mit unterschiedlichen relativen Feuchtigkeiten während 7 Tagen unter Temperaturbedingungen von 25°C als der Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalt verwendet. Für die Beurteilung der Verbackungseigenschaften wurde eine Probe, die vorher gesiebt worden war, um Teilchen mit einem Durchmesser von 425 µm bis 600 µm zu enthalten, in eine Styroporflasche mit einem Durchmesser von 37 mm gegeben und in Umgebungen unterschiedlicher relativer Feuchtigkeiten während 7 Tagen unter Temperaturbedingungen von 25°C gelagert. Dann wurden die Verbackungseigenschaften gemäß den folgenden Kriterien beurteilt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 3 gezeigt.

⊙ : Probe rieselt bereits beim Neigen des Behälters.

O: Wenn der Behälter ein Mal leicht angestoßen wird, rieselt die Probe.

Δ: Wenn der Behälter mehrere Male angestoßen wird, beginnt die Probe zu rieseln.

x: Wenn der Behälter fortgesetzt angestoßen wird, beginnt die Probe zu rieseln.

xx: Selbst bei fortgesetztem Anstoßen verbleiben Klumpen.

Tabelle 1 L-Lys-Gehalt

	Vergleichsbeispiel 1	Beispiel 1	Vergleichsbeispiel 2	Beispiel 2
Anion/L-Lysinverhältnis	-0,0133	0,6984	0,6903	0,9622
L-Lys-Gehalt	94%	72%	83,2%	67%

Tabelle 2 Ergebnisse der Messung des Gleichgewichts-Feuchtigkeitsgehalts

	Vergleichsbeispiel 1	Beispiel 1	Vergleichsbeispiel 2	Beispiel 2
Anion/L-Lysinverhältnis	-0,0133	0,6984	0,6903	0,9622
Relative Feuchtigkeit 33%	5,9%	3,00%	0,69%	2,88%
Relative Feuchtigkeit 43%	6,5%	4,24%	1,00%	3,46%
Relative Feuchtigkeit 58%	8,5%	7,95%	1,23%	5,76%
Relative Feuchtigkeit 65%	14,9%	10,87%	4,53%	8,12%

Tabelle 3 Ergebnisse der Beurteilung der Verbackungseigenschaften

	Vergleichs- beispiel 1	Beispiel 1	Vergleichsbei- spiel 2	Beispiel 2
Anion/L- Lysin- verhältnis	-0,0133	0,6984	0,6903	0,9622
Relative Feuchtig- keit 33 %	××	⊙	⊙	⊙
Relative Feuchtig- keit 43 %	××	⊙	○	⊙
Relative Feuchtig- keit 58 %	××	○	○	○
Relative Feuchtig- keit 65 %	××	○	△	○

[0069] Es zeigte sich, dass in Beispiel 1, wo das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf 0,6984 eingestellt wurde, die hygroskopische Eigenschaft und die Verbackungseigenschaft nicht nachließen, und dass der L-Lysingehalt im Vergleich zu Vergleichsbeispiel 2 erhöht war. Außerdem war in Vergleichsbeispiel 1, obwohl der L-Lysingehalt im Vergleich zu Beispiel 1 erhöht war, die hygroskopische Eigenschaft stark, die Verbackungseigenschaft ließ ebenfalls deutlich nach, so dass die Lagerungsstabilität nicht sichergestellt werden konnte. Deshalb kann gefolgert werden, dass das trockene granuliert Produkt des Beispiels 1 überlegen ist, wenn der L-Lysingehalt, die hygroskopische Eigenschaft und die Verbackungseigenschaft zusammen beurteilt werden.

[0070] Außerdem wurde auch in Beispiel 2, worin das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin auf 0,6903 eingestellt war, bestätigt, dass die hygroskopische Eigenschaft und die Verbackungseigenschaft nicht beeinträchtigt waren und dass der L-Lysingehalt im Vergleich zu Vergleichsbeispiel 2 verbessert war.

Beispiel 3 (nur Bezugsbeispiel)

[0071] Das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin einer L-Lysin-Fermentationslösung wurde unter Verwendung einer Lösung einer L-Lysinbase eingestellt, und es wurde ein trockenes granuliertes Produkt hergestellt.

[0072] L-Lysin wurde durch dasselbe Fermentationsverfahren wie in dem vorstehend beschriebenen Beispiel 1 produziert. Die Kulturbrühe wurde zentrifugiert, um Zellen auszufällen, wobei ein Überstand erhalten wurde. Dann wurde der Überstand in einem Rotationsverdampfer (EYELA ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-3NW) konzentriert, bis die Konzentration der Trockenmasse 55% wurde.

[0073] Außerdem wurde zu dem vorstehenden Konzentrat eine konzentrierte Lösung von L-Lysinbase, die auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 hergestellt wurde, gegeben, so dass das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin 0,8383 wurde. Die erhaltene Lösung wurde als Einspeisungslösung für das Granulationstrocknen eingesetzt.

[0074] Ein Teil der Einspeisungslösung für das Granulationstrocknen in einem Volumen von 1 l wurde unter Verwendung eines Sprühtrockners (Pulvis GB22, Yamato Scientific) getrocknet, wobei ein Pulver erhalten wurde. Das erhaltene Pulver als Keimteilchen und die verbleibende Einspeisungslösung für die Granulationstrocknung, die nicht für das Trocknen in dem Sprühtrockner eingesetzt wurde, als Bindemittellösung wurden in einem Granulationstrockner (SPIR-A-FLOW, Freund) eingespeist, und es wurde ein Granulationstrocknen durchgeführt, wobei ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wurde.

Vergleichsbeispiel 3

[0075] Nach dem Durchführen der Fermentation wurden die Entfernung der Zellen und die Konzentration auf die selbe Weise wie in Beispiel 3 durchgeführt, das Konzentrat wurde mit einer auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 hergestellten Lösung von L-Lysinbase versetzt, so dass das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin des

Konzentrats 0,4302 wurde, und das Konzentrat wurde als Einspeisungslösung für das Granulationstrocknen eingesetzt. Dann wurde das Granulationstrocknen auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 durchgeführt, wobei ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wurde.

Vergleichsbeispiel 4

[0076] Nach dem Durchführen der Fermentation, der Entfernung der Zellen und der Konzentration auf dieselbe Weise wie in Beispiel 3 wurde das erhaltene Konzentrat für die Granulationstrocknung ohne Einstellen des Äquivalentverhältnisses Anion/L-Lysin eingesetzt. Das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin des trockenen granulierten Produkts war 1,0772.

[0077] Die Lysingehalte sowie die Ergebnisse der Gleichgewichtsfeuchtigkeitsmessung und die Beurteilung der Verbackungseigenschaft der in Beispiel 3, Vergleichsbeispielen 3 und 4 erhaltenen trockenen granulierten Produkte sind in den Tabellen 4 bis 6 gezeigt.

Tabelle 4 L-Lys-Gehalt

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 3	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,8383	1,0772
L-Lys-Gehalt	79%	69%	64%

Tabelle 5 Ergebnisse der Messung des Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalts

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 3	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,8383	1,0772
Relative Feuchtigkeit 33%	3,1%	2,78%	3,28%
Relative Feuchtigkeit 43%	3,8%	3,39%	3,99%
Relative Feuchtigkeit 58%	5,1%	5,78%	6,98%
Relative Feuchtigkeit 65%	11,9%	8,15%	10,12%

Tabelle 6 Ergebnisse der Beurteilung der Verbackungseigenschaft

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 3	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,8383	1,0772
Relative Feuchtigkeit 33 %	⊙	⊙	⊙
Relative Feuchtigkeit 43 %	△	⊙	△
Relative Feuchtigkeit 58 %	××	○	×
Relative Feuchtigkeit 65 %	××	○	×

[0078] Es zeigt sich, dass das Produkt des Beispiels 3 einen geringeren Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalt und geringere hygroskopische Eigenschaften hatte, obwohl es einen niedrigeren L-Lysingehalt im Vergleich

zu dem Produkt des Vergleichsbeispiels 3 hatte. Die Verbackungseigenschaft des Produkts des Beispiels 3 war im Vergleich zu dem Produkt des Vergleichsbeispiels 3 ebenfalls vorteilhaft.

[0079] Außerdem hatte das Produkt des Beispiels 3 einen höheren L-Lysingehalt, geringere hygroskopische Eigenschaften und geringere Verbackungseigenschaften im Vergleich zu dem Produkt des Vergleichsbeispiels 4.

Beispiel 4

Einstellung des Äquivalentverhältnisses Anion/L-Lysin durch die Fermentationsbedingungen (1)

(1) Impfkultur von Lysin-produzierenden Bakterien

[0080] Ein Medium, das 45 g/l Glucose, 15 g/l Melasse, 2 g/l (als Stickstoff) Sojabohnenproteinhydrolysat, 2 g/l KH_2PO_4 , 5,6 g/l NaOH, 10 g/l Ammoniumsulfat, 0,8 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,8 mg/l Thiaminhydrochlorid und 0,2 mg/l Biotin enthielt (pH 6,0), wurde in einen 1 l-Glasfermentationsbehälter in einem Volumen von 300 ml eingeführt und durch Erhitzen bei 120°C während 20 Minuten sterilisiert. Nachdem der Fermentationsbehälter auf 31,5°C gekühlt war, wurden 5 Platinösen *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 31269 (vgl. U.S. Patent Nr. 4,066,501), der vorher auf einer LB-Platte 24 Stunden gezüchtet worden war, in das Medium eingepflegt und bei 31,5°C und pH 7,0 während 30 Stunden unter ausreichendem Belüften und Rühren kultiviert.

(2) Hauptkultur

[0081] Ein Medium, das 30 g/l Glucose, 45 g/l Melasse, 2 g/l (als Stickstoff) Sojabohnenproteinhydrolysat, 1,4 g/l Phosphorsäure, 1,2 g/l NaOH, 30 g/l Ammoniumsulfat, 1,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/l Thiaminhydrochlorid und 0,75 mg/l Biotin enthielt (pH 5,0), wurde in einen 1-l-Glasfermentationsbehälter in einem Volumen von 300 ml eingeführt und durch Erhitzen bei 120°C während 20 Minuten sterilisiert. Nach dem Abkühlen des Fermentationsbehälters auf 31,5°C wurden 45 ml der vorstehend beschriebenen Impfkultur in das Medium eingepflegt, und die Kultivierung wurde bei 34°C unter Belüftung bei 1/2 vvm und ausreichendem Rühren durchgeführt.

[0082] Nachdem eine festgelegte Menge des nachstehend gezeigten Einspeisungsmediums in die Kulturbrühe eingespeist worden war, war die Kultivierung fertig gestellt, wenn das Saccharid in der Kulturbrühe vollständig verbraucht war. Die Kultur wurde bei pH 7,0 gestartet, und der pH-Wert wurde allmählich auch 8,0 eingestellt. Gleichzeitig wurde der Druck in dem Behälter von 0 auf 0,12 MPa verändert.

Einspeisungsmedium

[0083] Medium, das 530 g/l Glucose, 1,4 g/l (als Stickstoff) Sojabohnenproteinhydrolysat, 1,0 g/l KOH, 44 g/l Ammoniumchlorid, 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,35 mg/l Thiaminhydrochlorid und 0,35 mg/l Biotin enthält (pH 5,5).

[0084] Nach dem vollständigen Ablauf der Kultivierung hatte die Fermentationslösung ein Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von 0,7518.

[0085] Die Kulturbrühe wurde zentrifugiert, um die Zellen auszufällen, wobei ein Überstand erhalten wurde, der in einem Rotationsverdampfer (EYELA ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-3NW) konzentriert wurde, bis die Konzentration der Feststoffe 55% wurde.

[0086] Dann wurde das halbe Volumen der konzentrierten Lösung unter Verwendung eines Sprühtrockners (Pulvis GB22, Yamato Scientific) sprühgetrocknet. Das erhaltene Pulver wurde als Keimteilchen und die verbleibende konzentrierte Lösung, die nicht für das Trocknen in dem Sprühtrockner eingesetzt wurde, wurde als Bindemittellösung in den Granulationstrockner (SPIR-A-FLOW, Freund), und das Granulationstrocknen wurde durchgeführt, wobei ein trockenes granuliertes Produkt erhalten wurde.

[0087] Die Lysingehalte sowie die Ergebnisse der Messung des Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalts und die Beurteilung der Verbackungseigenschaft der in Beispiel 4, Vergleichsbeispielen 3 und 4 erhaltenen trockenen granulierten Produkte sind in den Tabellen 7 bis 9 gezeigt.

Tabelle 7 L-Lys-Gehalt

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 4	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,7518	1,0772
L-Lys-Gehalt	79%	73%	64%

Tabelle 8 Ergebnisse der Messung des Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalts

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 3	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,7518	1,0772
Relative Feuchtigkeit 33%	3,1%	3,53%	1,45%
Relative Feuchtigkeit 43%	3,8%	4,91%	1,93%
Relative Feuchtigkeit 58%	5,1%	9,56%	4,08%
Relative Feuchtigkeit 65%	11,9%	12,42%	6,36%

Tabelle 9 Ergebnisse der Beurteilung der Verbackungseigenschaft

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 4	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,7518	1,0772
Relative Feuchtigkeit 33 %	⊙	⊙	⊙
Relative Feuchtigkeit 43 %	△	○	△
Relative Feuchtigkeit 58 %	××	△	×
Relative Feuchtigkeit 65 %	××	×	××

[0088] Das in Beispiel 4 erhaltene trockene granuliert Produkt hatte einen höheren L-Lysingehalt als das Produkt des Vergleichsbeispiels 4. Obwohl das Produkt des Beispiels 4 einen leicht höheren Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalt hatte, zeigte es außerdem eine geringe Verbackungseigenschaft, so dass es praktisch eingesetzt werden kann.

[0089] Obwohl das trockene granuliert Produkt des Beispiels 4 im Vergleich zu dem Produkt des Vergleichsbeispiels 3 einen geringeren L-Lysingehalt hatte, zeigte das Produkt des Beispiels 4 außerdem keine deutliche Verbackungseigenschaft selbst unter einer Bedingung mit 58% relativer Feuchtigkeit, während das Produkt des Vergleichsbeispiels 3 eine starke Verbackungseigenschaft zeigte.

Beispiel 5

Einstellung des Gewichtsverhältnisses Anion/L-Lysin durch die Fermentationsbedingungen (2)

(1) Impfkultur von L-Lysin-produzierenden Bakterien

[0090] Ein Medium, das 40 g/l Glucose, 0,6 g/l (als Stickstoff) Sojabohnenproteinhydrolysat, 1 g/l KH_2PO_4 , 5,6 g/l NaOH, 1,0 g/l Ammoniumsulfat, 10 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 10 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ enthielt (pH 6,0), wurde in einen 1-l-Glasfermentationsbehälter in einem Volumen von 300 ml gegeben und 20 Minuten durch Erhitzen bei 120°C sterilisiert. Nach dem Abkühlen des Fermentationsbehälters auf 31,5°C wurden 5 Platinösen Escherichia coli W3110(tyrA)/pCABD2 (Internationale Patentveröffentlichung WO95/16042), der vorher 24 Stunden auf einer LB-Platte gezüchtet worden war, in das Medium eingepflegt und bei 37°C und einem pH-Wert von 6,0 während 24 Stunden unter ausreichendem Belüften und Rühren kultiviert.

(2) Hauptkultur

[0091] Ein Medium, das 30 g/l Glucose, 0,4 g/l (als Stickstoff) Sojabohnenproteinhydrolysat, 0,5 g/l KH_2PO_4 , 20 g/l Ammoniumsulfat, 1,0 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 30 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ enthielt (pH 5,0), wurde in einen 1-l-Glasfermentationsbehälter in einem Volumen von 300 ml eingeführt und durch Erhitzen bei 120°C während 20 Minuten sterilisiert. Nach dem Abkühlen des Fermentationsbehälters auf 31,5°C wurden 50 ml der vorstehend beschriebenen Keimkultur in das Medium eingepflegt, und die Kultur wurde bei 34°C unter Belüftung bei 1/2 vvm und unter ausreichendem Rühren durchgeführt.

[0092] Als die Saccharidkonzentration in der Kulturbrühe 5 g/l oder weniger wurde, wurde eine Lösung, die 760 g/l Glucose enthielt, durch das in der offengelegten Japanischen Patentanmeldung Nr. 5-30985 beschriebene Verfahren auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 eingespeist. Genauer gesagt wurden der pH-Wert und die Konzentration des aufgelösten Sauerstoffs gemessen, um den Verbrauchsstatus der Kohlenstoffquelle auf der Grundlage der Veränderung der Messwerte festzustellen, und das Medium wurde eingespeist, um die Konzentration der Kohlenstoffquelle in der Kulturbrühe auf 5 g/l oder weniger zu halten.

[0093] Nachdem eine vorbestimmte Menge des Keimmediums eingespeist wurde, war die Kultivierung beendet, wenn das Saccharid in der Kulturbrühe vollständig verbraucht war. Die Kultur wurde bei pH 6,5 gestartet, und der pH-Wert wurde allmählich auf 8,0 eingestellt. Gleichzeitig wurde der Druck in dem Behälter von 0 auf 0,1 MPa geändert.

[0094] Nach dem vollständigen Ablauf der Kultivierung hatte die Fermentationslösung ein Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von 0,8574.

[0095] Die Kulturbrühe wurde zentrifugiert, um die Zellen auszufällen und abzutrennen, und der erhaltene Überstand wurde in einem Rotationsverdampfer (EYELA ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-3NW) konzentriert, bis die Konzentration der Feststoffe 55% wurde. Dann wurde die Hälfte des Volumens der konzentrierten Lösung unter Verwendung eines Sprühtrockners (Pulvis GB22, Yamato Scientific) sprühgetrocknet. Das erhaltene Pulver wurde als Keimteilchen und die verbleibende konzentrierte Lösung, die nicht für das Trocknen in dem Sprühtrockner eingesetzt wurde, wurde als Bindemittelösung in den Granulationstrockner (SPIR-A-FLOW, Freund) eingespeist, und das Granulationstrocknen wurde durchgeführt, um ein trockenes granuliertes Produkt zu erhalten.

[0096] Die Lysingehalte sowie die Ergebnisse der Messung des Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalts und die Beurteilung der Verbackungseigenschaft der trockenen granulierten Produkte, die in Beispiel 5 und den Vergleichsbeispielen 3 und 4 erhalten wurden, sind in den Tabellen 10 bis 12 gezeigt.

Tabelle 10 L-Lys-Gehalt

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 5	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,8574	1,0772
L-Lys-Gehalt	79%	70%	64%

Tabelle 11 Ergebnisse der Messung des Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalts

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 5	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,8574	1,0772
Relative Feuchtigkeit 33%	3,1%	2,94%	1,45%
Relative Feuchtigkeit 43%	3,8%	4,01%	1,93%
Relative Feuchtigkeit 58%	5,1%	7,78%	4,08%
Relative Feuchtigkeit 65%	11,9%	10,23%	6,36%

Tabelle 12 Ergebnisse der Beurteilung der Verbackungseigenschaft

	Vergleichsbeispiel 3	Beispiel 5	Vergleichsbeispiel 4
Anion/L-Lysinverhältnis	0,4302	0,8574	1,0772
Relative Feuchtigkeit 33 %	⊙	⊙	⊙
Relative Feuchtigkeit 43 %	△	○	△
Relative Feuchtigkeit 58 %	××	△	×
Relative Feuchtigkeit 65 %	××	△	××

[0097] Das in Beispiel 5 erhaltene trockene granuliert Produkt hatte im Vergleich zu dem Produkt des Vergleichsbeispiels 4 einen höheren Lysingehalt. Obwohl das Produkt des Beispiels 4 eine leicht stärkere hygroskopische Eigenschaft, beurteilt auf der Grundlage des Gleichgewichtsfeuchtigkeitsgehalts, hatte, zeigte es umgekehrt jedoch auch eine vorteilhafte Verbackungseigenschaft.

[0098] Obwohl das Produkt des Beispiels 5 im Vergleich zu dem Produkt des Vergleichsbeispiels 3 außerdem einen niedrigeren L-Lysingehalt hatte, zeigte es selbst unter einer Bedingung von 58% relativer Feuchtigkeit vorteilhafte Rieselfähigkeit, während das Produkt des Vergleichsbeispiels 3 starke Verbackungseigenschaft zeigte.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines getrockneten granulierten Produkts, das L-Lysin enthält und die folgende Zusammensetzung aufweist:

L-Lysin-Gehalt in der Trockenmasse: 40 bis 85 Gew.-%

Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin: 0,68 bis 0,95

Feuchtigkeitsgehalt: 5 Gew.-% oder weniger

worin das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin ein Wert ist, der nach der folgenden Gleichung unter Einsetzen des L-Lysin(L-Lys)-Gehalts, des Sulfationengehalts, des Chloridionengehalts, des Ammoniumionengehalts, des Natriumionengehalts, des Kaliumionengehalts, des Magnesiumionengehalts und des Calciumionengehalts in der Trockenmasse des getrockneten granulierten Produkts berechnet wird:

$$\text{Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin} = (2 \times [\text{SO}_4^{2-}] + [\text{Cl}^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{Na}^+] - [\text{K}^+] - 2 \times [\text{Mg}^{2+}] - 2 \times [\text{Ca}^{2+}]) / [\text{L-Lys}]$$

worin ρ eine Molkonzentration bedeutet,

wobei das Verfahren die Stufen umfaßt, bei denen Chlorwasserstoffsäure oder Schwefelsäure zu einer Ausgangsmaterial-L-Lysin-Lösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von weniger als 0,68 gegeben wird, um das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin der Ausgangsmateriallösung auf einen Bereich von 0,68 bis 0,95 einzustellen, und das getrocknete granuliert Produkt aus der erhaltenen L-Lysinlösung oder einem Konzentrat davon erhalten wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Ausgangsmaterial-L-Lysin-Lösung dadurch erhalten wird, daß eine L-Lysin enthaltende wässrige Lösung auf ein Kationenaustauscherharz zur Adsorption des L-Lysins an das Harz aufgetragen wird und das an das Harz adsorbierte L-Lysin mit wässrigem Ammoniak, wässriger Ammoniumchloridlösung oder beiden eluiert wird.

3. Verfahren zum Herstellen eines getrockneten granulierten Produkts, das L-Lysin enthält, welches die Stufen umfaßt, bei denen ein Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Produktion von L-Lysin in einem Medium unter einer aeroben Bedingung kultiviert wird, wobei L-Lysin in dem Medium hergestellt und angehäuft wird, und das getrocknete Produkt aus dem Medium erhalten wird,

wobei die Kultivierung durchgeführt wird, um eine L-Lysin enthaltende Fermentationslösung zu erhalten, während der pH-Wert des Mediums während der Kultivierung auf 6,5 bis 9,0 kontrolliert wird und am Ende der Kultivierung auf 7,2 bis 9,0 kontrolliert wird, wobei der Druck in dem Fermentationsbehälter während der Kultivierung auf einen positiven Wert kontrolliert wird, oder Kohlendioxid oder ein Kohlendioxid enthaltendes Mischgas in das Medium gegeben wird, so daß sich eine Kultivierungsperiode ergeben sollte, in der Bicarbonat- und/oder Carbonationen in dem Medium in einer Menge von 2 g/L oder mehr enthalten sind,

bei Bedarf Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure oder eine L-Lysin-Lösung mit einem Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin von mehr als 0,95 zu der Fermentationslösung gegeben wird, so daß die Fermentationslösung ein Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin im Bereich von 0,68 bis 0,95 haben sollte, und

die Fermentationslösung unter vermindertem Druck konzentriert wird, und das erhaltene Konzentrat granuliert und getrocknet wird, wobei ein trocknes Granulatprodukt erhalten wird, das L-Lysin enthält und die folgende Zusammensetzung aufweist:

L-Lysin-Gehalt in der Trockenmasse: 40 bis 85 Gew.-%

Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin: 0,68 bis 0,95

Feuchtigkeitsgehalt: 5 Gew.-% oder weniger,

worin das Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin ein Wert ist, der nach der folgenden Gleichung unter Einsetzen des L-Lysin(L-Lys)-Gehalts, des Sulfationengehalts, des Chloridionengehalts, des Ammoniumionengehalts, des Natriumionengehalts, des Kaliumionengehalts, des Magnesiumionengehalts und des Calciumionengehalts in der Trockenmasse des getrockneten granulierten Produkts berechnet wird:

$$\text{Äquivalentverhältnis Anion/L-Lysin} = (2 \times [\text{SO}_4^{2-}] + [\text{Cl}^-] - [\text{NH}_4^+] - [\text{Na}^+] - [\text{K}^+] - 2 \times [\text{Mg}^{2+}] - 2 \times [\text{Ca}^{2+}]) / [\text{L-Lys}]$$

worin ρ eine Molkonzentration bedeutet.

Es folgen keine Zeichnungen