



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 101 30 024 A 1**

51 Int. Cl.⁷:
C 12 N 1/20

21 Aktenzeichen: 101 30 024.7
22 Anmeldetag: 25. 6. 2001
43 Offenlegungstag: 23. 1. 2003

DE 101 30 024 A 1

<p>66 Innere Priorität: 101 26 949. 8 01. 06. 2001</p> <p>71 Anmelder: Holzapfel, Wilhelm, 76865 Rohrbach, DE</p> <p>74 Vertreter: Gassner, W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 91052 Erlangen</p>	<p>72 Erfinder: Bresch, Horst, Dr., 76131 Karlsruhe, DE; Brost, Iris, 76139 Karlsruhe, DE; Färber, Paul, Dr., 76131 Karlsruhe, DE; Geisen, Rolf, Dr., 76131 Karlsruhe, DE; Holzapfel, W.H., Prof. Dr., 76131 Karlsruhe, DE; Jany, Klaus-Dieter, Prof. Dr., 76131 Karlsruhe, DE; Mengu, Moses, Taastrup, DK; Jakobsen, Mogens, Prof. Dr., Frederiksberg, DK; Steyn, Piet S., Prof. Dr., Stellenbosch, ZA; Teniola, David, Dr., Lagos, NG; Addo, Peter, Accra, GH</p> <p>56 Entgegenhaltungen: MANN, R., REHM, H.J.: Degradation of Aflatoxin B₁ by Mikroorganismen. In: Naturwissenschaften. 1975, Vol. 62, S. 537-538;</p>
--	---

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- 54 Actinomyceten zum Abbau von Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A
- 57 Die Erfindung betrifft die Verwendung bakterieller Stämme der Gattungen Rhodococcus, Mycobacterium, Gordonia, Pseudonocardia, Streptomyces, Nocardioopsis, Nocardioides, Bifidobacterium, Actinomyces, Rothia, Saccharothrix, Gallionella, Actinoplanes, Frankia und Clavibacter zum Abbau von Aflatoxin B₁ und/oder Ochratoxin A.

DE 101 30 024 A 1

- [0001]** Die Erfindung betrifft Actinomyceten zum Abbau von Aflatoxin B₁ und/oder Ochratoxin A sowie neue Stämme von Actinomyceten.
- 5 **[0002]** Das Mykotoxin Aflatoxin B₁ ist eine Hauptkomponente des Aflatoxinkomplexes, der ein Stoffwechselprodukt bestimmter Stämme von *Aspergillus flavus*, *A. nomius* und *A. parasiticus* ist. Aflatoxin B₁ ist eines der stärksten bekannten natürlich vorkommenden Mutagene und Kanzerogene. Es findet sich in vielen Lebensmitteln und Rohstoffen wie beispielsweise Erdnüssen, Sojabohnen, Sorghum, Hirse, Getreide und daraus hergestellten Produkten, auf denen sich die Aflatoxin B₁ bildenden Schimmelpilze ansiedeln. Der Verzehr von Lebensmitteln, die mit Aflatoxin B₁ kontaminiert sind, stellt für Menschen und Tiere u. U. eine ernste gesundheitliche Gefahr dar, da Aflatoxin B₁ kanzerogene, teratogene und hepatotoxische Wirkungen hat. Das Wachstum der Aflatoxin B₁ produzierenden Schimmelpilze ist nicht immer ein Indiz, daß das Mykotoxin tatsächlich vorhanden ist. Aflatoxin B₁ wird nur unter bestimmten Bedingungen synthetisiert, zu denen Feuchtigkeit, Temperatur, Art des Substrates, Wettbewerb mit anderer Mikroflora, Belüftung und auch genetische Anforderungen gehören.
- 10 **[0003]** Die Bildung von Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A auf Lebensmitteln ist somit ein grundlegendes gesundheitliches und wirtschaftliches Problem mit weltweiter Bedeutung.
- [0004]** Nach dem Stand der Technik ist es bekannt, das Aflatoxin B₁ mit physikalischen und chemischen Techniken abgebaut werden kann. Die bekannten Verfahren sind jedoch mit Nachteilen verbunden, zu denen insbesondere die Verringerung der Qualität der Lebensmittel hinsichtlich ihrer Nähr- und organoleptischen Eigenschaften gehört. Darüber hinaus erfordert die Behandlung der Lebensmittel mit den bekannten Verfahren eine kostenintensive technische Ausrüstung. In vielen Fällen ist überdies die Behandlung ebenfalls mit gesundheitsschädlichen Wirkungen verbunden.
- 20 **[0005]** Es sind auch eine Vielzahl von Isolaten hinsichtlich ihrer Eignung, Aflatoxin B₁ abzubauen, untersucht worden. Dabei hat sich allerdings herausgestellt, daß ein großer Teil der bekannten Isolate Aflatoxin B₁ eher adsorbiert als tatsächlich abbaut. Die Adsorption von Aflatoxin B₁ hat jedoch den Nachteil, daß das Aflatoxin B₁ unter veränderten Bedingungen wieder freigesetzt werden kann.
- [0006]** Ein signifikanter Abbau von Aflatoxin B₁ wurde unter anderem bei einem Stamm von *Nocardia corynebacterioides*, DSM-Nr. bzw. DSM 12676, *Aspergillus niger*, *A. parasiticus*, *Trichoderma viride* und *Mucor ambiguus* festgestellt (Mann, R. und Reimt, H. J., Eur. J. Appl. Microbiol., 2 (1976), 297–306; Tsubouchi, H., et al., Shakuin Eiseigaku Zasshi, 24 2 (1983), 113–119; Line et al., J. Food Prot., 57 (1994), 788–791). Der Abbau des Aflatoxin B₁ mittels der bisher bekannten Isolate ist jedoch mit einer langen Abbauphase verbunden, die dauerhaft mehr als 72 Stunden beträgt. Überdies verringert die Pigmentierung mancher Stämme deren Eignung für einen Einsatz in der Lebensmittelindustrie. Ein Teil der Isolate produziert außerdem unter veränderten Bedingungen wieder Aflatoxin B₁, so daß ein Einsatz dieser Isolate bei Lebensmitteln ausgeschlossen ist.
- 30 **[0007]** Ein weiteres Mykotoxin ist Ochratoxin A. Ochratoxin A wird von verschiedenen Penizillium-Arten produziert. Es wirkt nierenschädigend und hat sich im Tierversuch als carcinogen wirksam erwiesen. Ochratoxin A kommt in Lebensmitteln, wie in Getreide oder Getreideprodukten, in Kaffee oder Kakao und deren Folgeprodukten, in Trockenfrüchten, in Rotwein, in rotem Traubensaft und in Süßholzextrakt-enthaltenden Süßwaren vor.
- [0008]** Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere Mikroorganismen angegeben werden, die Mykotoxine, insbesondere Aflatoxin B₁ und Ochratoxin A, mit deutlich verkürzter Abbauphase abbauen können, sowie neue Stämme mit dieser Eigenschaft.
- 40 **[0009]** Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 12 bis 14 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 11.
- [0010]** Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß Mikroorganismen eines bakteriellen Stamms ausgewählt aus einer der Gattungen *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Nocardioide*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Saccharothrix*, *Gallionella*, *Actinoplanes*, *Frankia* und *Clavibacter* in der Lage sind, Aflatoxin B₁ und/oder Ochratoxin A schnell und effektiv abzubauen. Das betrifft insbesondere die neuen Isolate *Rhodococcus erythropolis* (Aney3) sowie *Mycobacterium* sp. (Fa4) sowie Mutanten oder Varianten dieser Stämme. Die vorgenannten Isolate sind hinterlegt worden unter den DSM-Nrn. 14303 bzw. 14304. Ferner hat sich in dieser Hinsicht als besonders effektiv erwiesen der Stamm *Pseudonocardia hydrocarbonoxydans*, welcher unter der DSM-Nr. 4328 hinterlegt worden ist.
- 50 **[0011]** Zweckmäßigerweise werden die Mikroorganismen zum Abbau von Aflatoxin B₁ und/oder Ochratoxin A zerstört, so daß die von diesen gebildeten Enzyme freigesetzt werden. Vorzugsweise wird ein zellfreier Extrakt aus den Mikroorganismen hergestellt, der beispielsweise durch mittels einer French-press erhalten wird.
- [0012]** Mit dem aus den genannten Stämmen erhaltenen Zellfragmenten oder dem aus diesen Mikroorganismen gewonnenen Enzym wird das Aflatoxin B₁ oder Ochratoxin A-haltige Substrat, bei dem es sich beispielsweise um ein Lebensmittel handelt, versetzt. Bei dem Substrat kann es aber auch um Futtermittel handeln.
- 55 **[0013]** Die Inkubationszeit nach der Zugabe der Zellfragmente oder des Enzyms zu dem Aflatoxin B₁ oder Ochratoxin A-haltigen Substrat sollte 5 bis 25 Stunden, vorzugsweise weniger als 10 Stunden, betragen. Die Reaktionstemperatur sollte 10 bis 40°C, vorzugsweise 30°C betragen. Diese Temperatur ist besonders geeignet, da sie in tropischen Gebieten, wie Westafrika, die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens erleichtert.
- 60 **[0014]** Die Erfindung wird nachstehend anhand der Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:
- [0015]** Fig. 1 den prozentualen Aflatoxin B₁-Abbau in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Stämme *Nocardia corynebacterioides* DSM-Nr. 12676, *N. corynebacterioides* DSM-Nr. 20151, *Rhodococcus erythropolis* (Aney3; DSM-Nr. 14303) und *Mycobacterium* sp. (Fa4; DSM-Nr. 14304),
- [0016]** Fig. 2 den prozentualen Aflatoxin B₁-Abbau in Abhängigkeit von der Temperatur für die Stämme nach Fig. 1 und
- 65 **[0017]** Fig. 3 den prozentualen Ochratoxin-A-Abbau bei einer Inkubationszeit von 20 Stunden und einer Temperatur von 30°C für die Stämme nach Fig. 1.
- [0018]** Das folgende Beispiel veranschaulicht den schnellen und effektiven Abbau von Aflatoxin B₁ und/oder Ochra-

toxin A für die Stämme *Rhodococcus erythropolis* (Aney3; DSM-Nr. 14303) und *Mycobacterium* sp. (Fa4; DSM-Nr. 14304) im Vergleich zu den bekannten Stämmen *Nocardia corynebacterioides* DSM-Nr. 12676, *N. corynebacterioides* DSM-Nr. 20151, *Nocardia corynebacterioides* DSMZ 12676, *N. corynebacterioides* DSM-Nr. 20151 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Deutschland geliefert.

5

1. Wachstumsbedingungen und Biomasseherstellung

[0019] Die gefrorenen oder gefriergetrockneten Bakterienkulturen der Stämme *Nocardia corynebacterioides* (DSM-Nr. 12676), *N. corynebacterioides* (DSM-Nr. 20151), *Rhodococcus erythropolis* (Aney3) und *Mycobacterium* sp. (Fa4) wurden durch aufeinanderfolgende Kultivierungsschritte in Standard-I-Nährlösung (S-I-Medien, 1.07882,0500, Merck, Deutschland) reaktiviert. 20 ml der 24 h-Kulturlösung wurden verwendet, um 500 ml sterile (121°C/15 Min) STDI-Medien zu beimpfen. Die beimpften Kulturen wurden 48 h bei 30°C unter Schütteln bei 160 rpm (Gyrotary-Schüttelinkubator Modell G25, New Brunswick Scientific Co, USA) inkubiert. Die Zellen wurden durch 20 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 6000 rpm geerntet. Die erhaltenen Pellets wurden zweimal mit Phosphatpuffer (67 mM, pH 7,0) gewaschen.

10

15

2. Disintegration zur Herstellung zellfreier Extrakte

[0020] Die gemäß Ziff. 1 erhaltenen Pellets wurden zur Zellerstörung in Phosphatpuffer (pH 7,0) resuspendiert (3 ml Puffer pro Gramm Zellmasse). Die Suspension wurde dreimal mittels der French-press bei 1200 psi ($8,274 \times 10^6$ Pa) behandelt (Aminco French pressure cell press, SLM Instruments Inc.). Die Zellerstörungsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die disintegrierte Zellsuspension wurde 20 Minuten bei 4°C und 20.000 rpm zentrifugiert (Sorvall RC 26 plus, Kendo lab., Deutschland). Der Überstand wurde unter sterilen Bedingungen unter Verwendung von sterilen Cellulosepyrogen-freien Einmal-Filtern mit 0,2 µm Porengröße (Schleicher & Schuell, Deutschland) filtriert.

20

3.1 Aflatoxin B₁-Abbau

25

[0021] 20 µl einer Lösung von Aflatoxin B₁ in Methanol (LiChroSolv, Merck) wurden zu 730 µl des unter Ziff. 2 erhaltenen zellfreien Extraktes gegeben, so daß die Ausgangskonzentration an Aflatoxin B₁ 2,5 ppm betrug. Zur Bestimmung der optimalen Reaktions- oder Inkubationszeit wurde das Gemisch im Dunkeln 1, 2, 4, 6, 8 bzw. 24 h bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Zur Bestimmung der optimalen Temperatur wurde das Gemisch 20 h bei 10, 20, 30 oder 40°C und pH 7 inkubiert. Durch Zugabe von 750 µl HPLC-reinen Chloroforms (LiChroSolv, Merck) wurde die Inkubation beendet. Jeder Versuch wurde mehrmals wiederholt.

30

3.2 Ochratoxin A-Abbau

35

[0022] 100 µl einer Lösung von Ochratoxin A in Phosphatpuffer wurden zu 1000 µl des unter Ziff. 2 erhaltenen zellfreien Extraktes gegeben, so dass die Ausgangskonzentration an Ochratoxin A 20 ppm betrug. Die Inkubation wurde über eine Zeit von 20 Stunden durchgeführt.

4. Quantitative Analyse

40

[0023] Nach der Inkubation der zellfreien Extrakte wurde das Aflatoxin B₁ dreimal mit Chloroform (LiChroSolv, Merck) extrahiert, das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand mit Methanol (LiChroSolv, Merck) aufgenommen. Ein Teil der resultierenden Lösung wurde unmittelbar für die HPLC verwendet, während ein weiterer Teil bei -20°C im Dunkeln gelagert wurde.

45

[0024] Zur Isolierung des Ochratoxins A wurde den Inkubationsansätzen 100 µl 12,5%ige Salzsäure zugegeben, sowie 5 ml Natriumchloridlösung (118 g Natriumchlorid in 1000 ml destilliertem Wasser). Danach wurde zweimal mit je 5 ml Chloroform ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation zur Trennung der beiden flüssigen Phasen wurden die Chloroformphasen vereinigt und bei 50°C zur Trockene eingedampft.

[0025] Das zur quantitativen Analyse verwendete HPLC-System umfaßte folgende Komponenten: HPLC-Pumpe (L-7100, Merck), HPLC-Autosampler (L-7200, Merck) und einen Probenkühler, um die Proben temperatur bei 21°C zu halten. Zur Bestimmung der Aflatoxin B₁-Konzentration wurde ein Diodenarray-Nachweisgerät (HP1050, Hewlett-Packard, Deutschland) bei Wellenlängen von 230, 275, 315 und 365 nm verwendet. Als stationäre Phase wurde eine Umkehrphasen-C₁₈-Säule (LiChroCART 250-4 RP-18 (5 µm), Merck) in Verbindung mit einer Schutzsäule (LiChroCART 4-4 RP-18 (5 µm, Merck) verwendet. Die mobile Phase war ein Gemisch aus Acetonitril, Methanol und Wasser in einem Verhältnis in bezug auf das Volumen von 25 : 25 : 50. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 1,0 ml/min bei einem Druck von ca. 200 kPa. Mit Hilfe dieser Aflatoxin B₁-Analysen wurde die optimalen Inkubationstemperatur und Inkubationszeit zum Aflatoxin B₁-Abbau ermittelt.

55

[0026] Die quantitative Analyse des Ochratoxins A erfolgte wie im Falle des Aflatoxins mittels HPLC, wobei anstelle des Diodenarray-Nachweisgerätes ein Fluoreszenzdetektor verwendet wurde. Angeregt wurde die Probe mit Licht der Wellenlänge 330 nm, gemessen wurde bei 460 nm. Das Toxin wurde von der C18-Trennsäule eluiert mit einem Gemisch bestehend aus Acetonitril-Wasser-Essigsäure 46 : 54 : 1. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 1,0 ml/Minute.

60

5. Bestimmung der Proteinkonzentration

65

[0027] Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels des Mikrobiuret-Verfahrens gemessen. Die Referenzkurve wurde unter Verwendung einer bekannten Konzentration von bovinem Serumalbumin (BSA) erzeugt. Die Konzentration

an Rohprotein wurde aus der Referenzkurve ermittelt.

6. Ergebnis

5 **[0028]** Die Gesamtproteinkonzentration in den zellfreien Extrakten aller Isolate ist in Tabelle 1 gezeigt:

Tabelle 1

Stamm	Proteinkonzentration [mg/ml]
<i>Nocardia corynebacterioides</i> DSMZ 12676	1,5
<i>Nocardia corynebacterioides</i> DSMZ 20151	2,9
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	3,4
<i>Mycobacterium</i> sp.	3,8

25 **[0029]** Es ist aus Tabelle 1 zu erkennen, daß die zellfreien Extrakte von *Rhodococcus erythropolis* und *Mycobacterium* sp. höhere Konzentrationen an Protein enthielten als die Stämme von *Nocardia corynebacterioides*. Die unterschiedlichen Konzentrationen spiegeln die Anwesenheit von Protein, der funktionalen Einheit aller Organismen in den Proben der zellfreien Extrakte, wieder und sind auch ein Hinweis nährsubstratbedingt gebildeter Biomasse. Zwischen der Proteinkonzentration und der Aktivität Stämme besteht eine Korrelation.

30 **[0030]** Wie in Fig. 1 dargestellt, zeigten die vier Isolate unterschiedliche Abbauniveaus. *Rhodococcus erythropolis* und *Mycobacterium* sp. bauten jedoch gegenüber den bekannten Stämmen von *Nocardia corynebacterioides* das Aflatoxin B₁ wesentlich schneller und vollständiger ab. Innerhalb von einer Stunde bauten die neuen Stämme mehr als 70% des Aflatoxin B₁ ab, während die bekannten Stämme höchstens 30% abbauten. Nach vier Stunden hatten die neuen Stämme bereits mehr als 90% des Aflatoxin B₁ beseitigt, während die bekannten Stämme in diesem Zeitraum höchstens 60% abgebaut hatten. Nach acht Stunden war das Aflatoxin B₁ bei den Proben, die mit dem zellfreien Extrakt der neuen Stämme versetzt wurden, nahezu vollständig abgebaut, bei einem der bekannten Stämme hingegen nur zu höchstens 80%, bei dem anderen der bekannten Stämme nur zu 5%. Nach 24 Stunden konnte bei den neuen Stämmen sowie *Nocardia corynebacterioides* DSMZ 20151 kein Aflatoxin B₁ mehr nachgewiesen werden.

40 **[0031]** Die neuen Stämme von *Rhodococcus erythropolis* und *Mycobacterium* sp. bauten Aflatoxin B₁ somit deutlich schneller ab, Überdies wurden im Gegensatz zu den Stämmen von *Nocardia corynebacterioides* keine Pigmente gebildet, was ein wesentlicher Vorteil ist, wenn die neuen Stämme in einem Lebensmittelfermentationssystem eingesetzt werden. Die Qualität der Lebensmittel wird somit während der Fermentation von den neuen Stämmen nicht beeinträchtigt.

45 **[0032]** Fig. 2 zeigt einen Vergleich des Aflatoxin B₁-Abbaus der vier Stämme bei unterschiedlichen Temperaturen. Aus den Kurven für die Stämme von *Nocardia corynebacterioides* wird auf einen enzymatischen Abbau von Aflatoxin B₁ geschlossen, da die Aktivität bei 30°C höher als bei 10, 20 oder 40°C ist. Die Aktivität der neuen Stämme ist bei allen Temperaturen im wesentlichen dieselbe. Das legt die Vermutung nahe, daß die von diesen Bakterien entwickelten Enzyme in einem breiten Temperaturbereich wirken.

50 **[0033]** Fig. 3 zeigt die Wirksamkeit der Stämme *Nocardia corynebacterioides* (DSM-Nr. 20151), *Nocardia corynebacterioides* (DSM-Nr. 12676), *Mycobacterium* sp. (DSM-Nr. 14304) und *Rhodococcus erythropolis* (DSM-Nr. 14303) in Bezug auf den Abbau von Ochratoxin A. Die Inkubationszeit hat 20 Stunden und die Inkubationstemperatur 30°C betragen. Es zeigt sich, daß insbesondere die Stämme *Mycobacterium* sp. (DSM-Nr. 14304) sowie *Rhodococcus erythropolis* (DSM-Nr. 14303) besonders effektiv das Mykotoxin Ochratoxin A abbauen.

55 Patentansprüche

1. Verwendung von Mikroorganismen eines bakteriellen Stamms ausgewählt aus den Gattungen *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Nocardioidea*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Saccharothrix*, *Gallionella*, *Actinoplanes*, *Frankia* und *Clavibacter* zum Abbau von Aflatoxin B₁ und/oder Ochratoxin A.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Mikroorganismus *Rhodococcus erythropolis* (Aney3; DSM-Nr. 14303) ist sowie Mutanten oder Varianten davon.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Mikroorganismus *Mycobacterium* sp. (Fa4; DSM-Nr. 14304) ist sowie Mutanten oder Varianten davon.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Mikroorganismus *Pseudonocardia hydrocarbonoxydans* (DSM-Nr. 4328) ist sowie Mutanten oder Varianten davon.
5. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Behandlung von Lebens- und/oder Futtermitteln.
6. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei Zellfragmente des Mikroorganismus verwendet

werden.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei ein zellfreier Extrakt verwendet wird.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 oder 7, wobei die Inkubationszeit nach der Zugabe der Zellfragmente zu dem Aflatoxin B₁-haltigen Substrat oder Lebensmittel 5 bis 25 h beträgt.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die Inkubationszeit 10 h beträgt.

5

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei die Reaktionstemperatur nach der Zugabe der Zellfragmente zu dem Aflatoxin B₁-haltigen Substrat 10 bis 40°C beträgt.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Reaktionstemperatur 30°C ist.

12. Biologisch reine Kultur des Mikroorganismus *Rhodococcus erythropolis* (Aney3; DSM-Nr. 14303) sowie Mutanten oder Varianten davon.

10

13. Biologisch reine Kultur des Mikroorganismus *Mycobacterium* sp. (Fa4; DSM-Nr. 14304) sowie Mutanten oder Varianten davon.

14. Biologisch reine Kultur des Mikroorganismus *Pseudonocardia hydrocarbonoxydans* (DSM-Nr. 4328) sowie Mutanten oder Varianten davon.

15

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

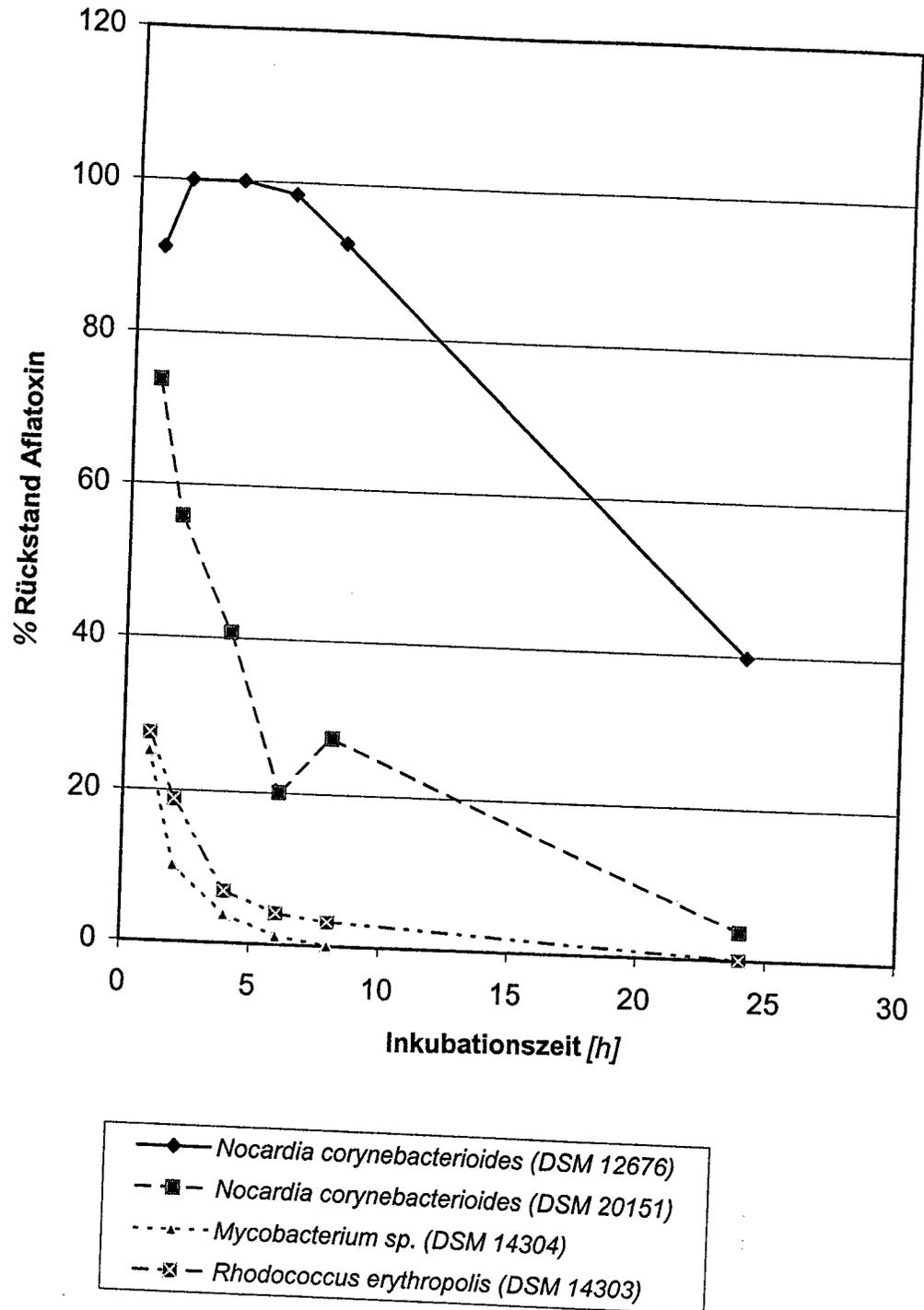


Fig. 1

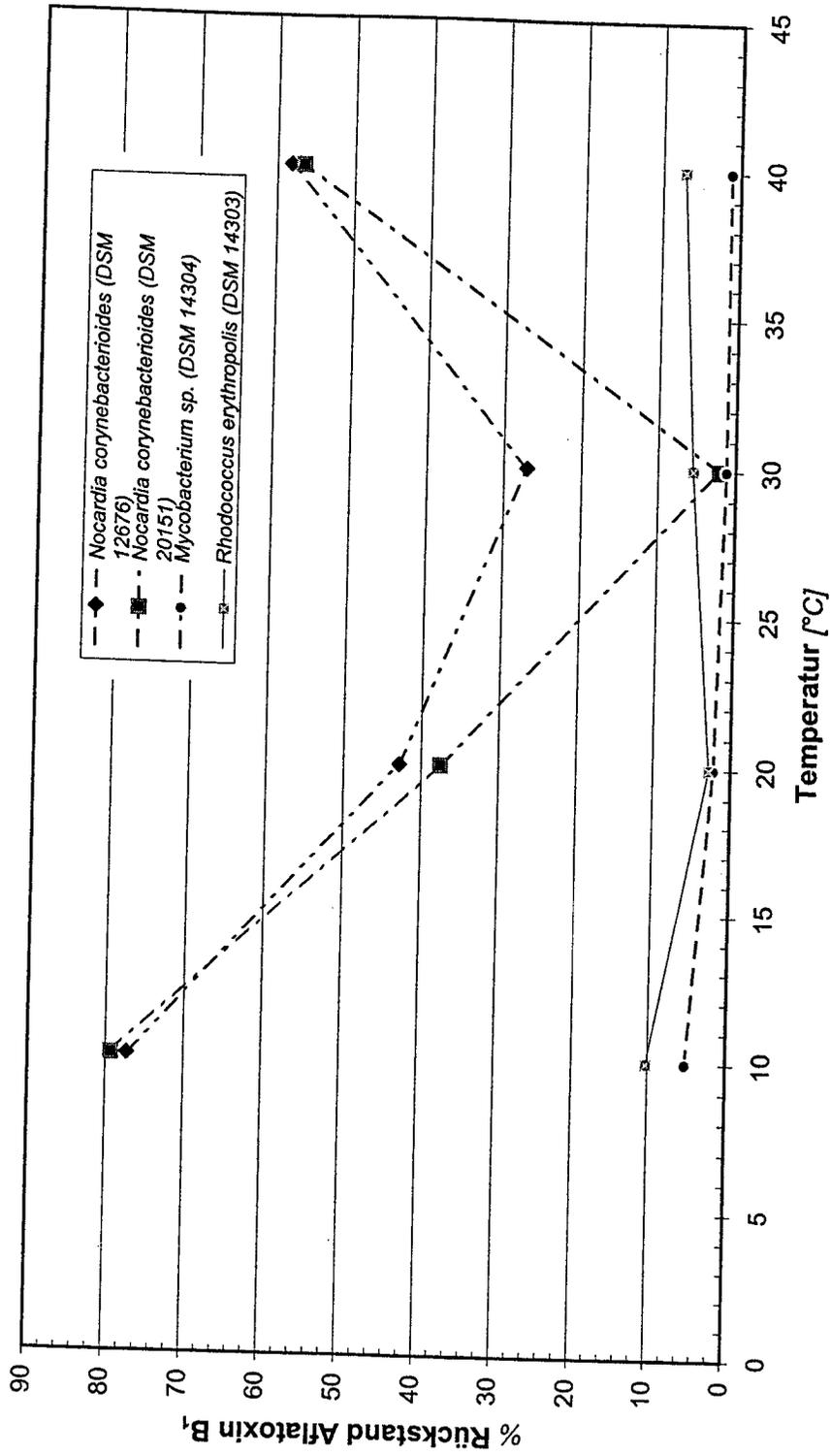


Fig. 2

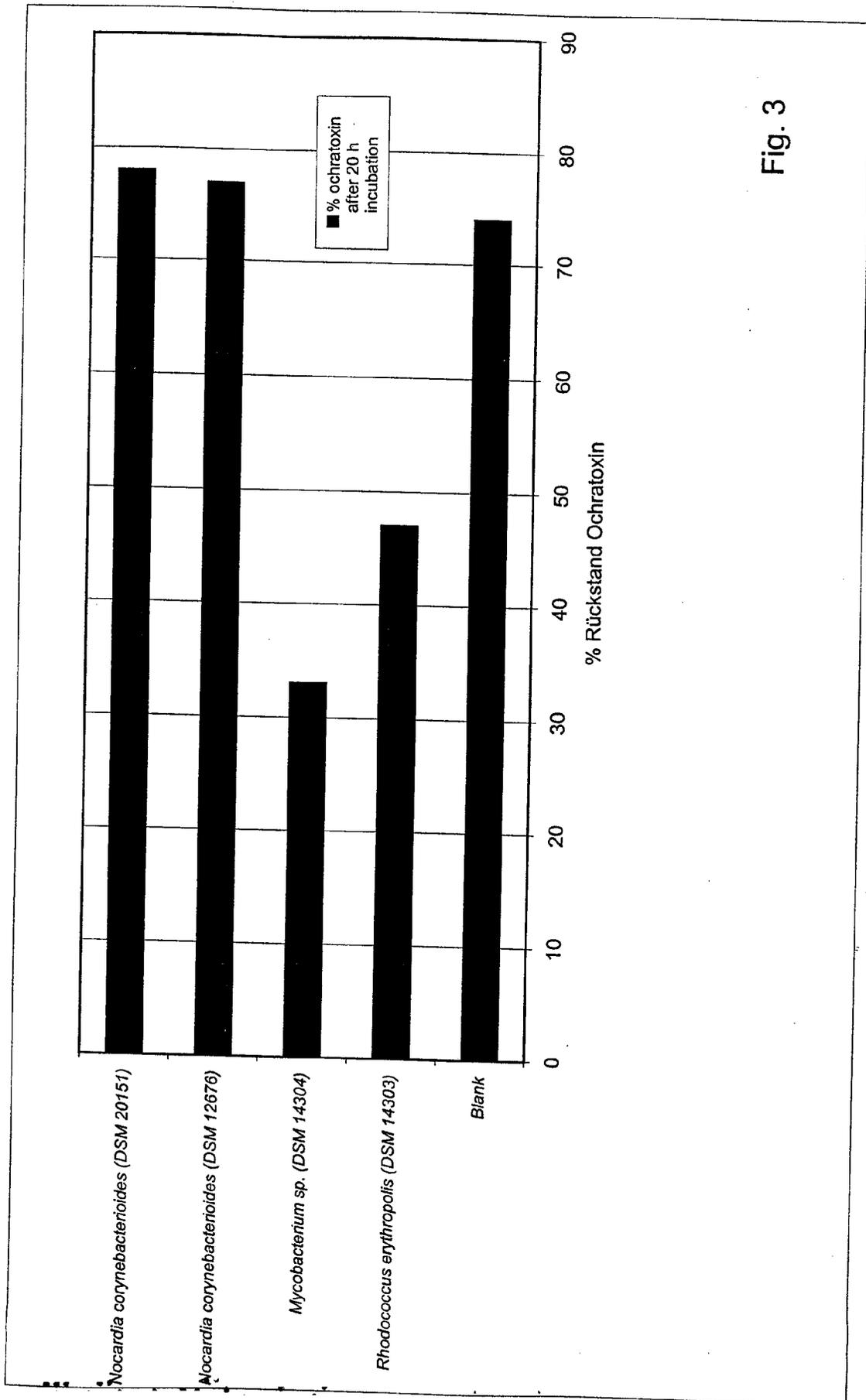


Fig. 3