



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN



(21) Patentansøgning nr.: 5033/80

(51) Int.Cl.⁴ C 12 N 9/92

(22) Indleveringsdag: 26 nov 1980

(41) Alm. tilgængelig: 30 maj 1981

(44) Fremlagt: 25 jul 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 29 nov 1979 BG 45721

(71) Ansøger: *INSTITUTE PO MICROBIOLOGIA; Akademik Bonchev Street, Block II; Sofia, BG

(72) Opfinder: Mitko Stoychev *Popov; BG, Galina Mihaylovna *Djedjeva; BG, Ivan Ognyanov *Todorov; BG, Nelly Stoycheva *Stoeva; BG

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Fremgangsmåde til frembringelse af glucoseisomerase

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5033-80

En Streptomyces-stamme sp. N.1339, deponeret 29/9-1979 ved The State Institute for Drugs Control, - bul. Vladimir Zaimov N.26, under nummeret 144, dyrkes i 36-72 timer i et xyloseholdigt vækstmedium ved en temperatur på 24-36°C og en begyndelses-pH-værdi på mellem 6,5 og 9,0.

Myceliet kan efter centrifugering og vask bruges direkte til isomerisering af glucose til fructose, idet den anvendte stamme er i stand til at syntetisere en stor mængde af enzymet glucoseisomerase. Til isomeriseringen kan også anvendes tørret mycelium, et celleekstrakt eller ekstracellulær glucoseisomerase. Isomeriseringsreaktionen udføres ved en temperatur mellem 50 og 80°C, en pH-værdi mellem 6,0 og 9,0 og i nærværelse af fra 5×10^{-5} til 1×10^{-3} M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, fra 1×10^{-4} til 1×10^{-1} M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ og en substratkoncentration på fra 0,1 til 3M.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af glucose-isomerase ved dyrkning af en stamme af slægten *Streptomyces* ved en temperatur på 24-36°C i et næringsmedium med en begyndelses-pH-værdi mellem 6,5 og 9,0 og indeholdende xylose.

Det er kendt, at D-glucose ved hjælp af enzymet glucoseisomerase omdannes til D-fructose, som anvendes i stigende grad inden for fødevarerindustrien og ved fremstilling af diætfødevarer i et antal udviklede lande. Glucoseisomerase giver i kombination med et kompleks af amylolytiske enzymer (α -amylase og glucoamylase) mulighed for at opnå glucose-fructose-sirupper og fructose direkte fra stivelse under anvendelse af enzymer.

Nogle metoder til frembringelse af glucoseisomerase har været kendt siden 1957, da R.O.Marshall og E.R.Kooi (28) for første gang påviste, at det var muligt at omdanne D-glucose direkte til D-fructose ved hjælp af celler, der tilhører bakteriestammen *Pseudomonas hydrophila* N.491 og 492. Til frembringelse af glucoseisomerase anvendes for det meste mikroorganismer af *Streptomyces*-slægten og frem for alt arterne *Streptomyces phaeochromogenes* (32,36), *S. venezuela* (1,23), *S. griseus* (22), *S. wedmorensis* (2), *S. albus* (33), *S. flavovirens*, *S. acromogenes*, *S. echinatus* (34), *S. olivocinereus* (19,23,25), *S. acromogenes*, *S. olivaceus* (16,17), samt andre. Foruden *Streptomyces*-slægten findes der andre aktive producenter af ordenen Actinomycetales, som tilhører slægterne: *Nocardia*, *Micromonospora* (20,21), *Actinoplanes* (29,30), *Thermoactinomyces*, *Thermopolyspora* (35) samt også nogle andre bakteriestammer, der tilhører slægterne: *Aerobacter* (19), *Acetobacter* (27), *Lactobacillus* (24), *Bacillus* (31), *Arthrobacter* (26), *Flavobacterium* (3), samt andre.

Ved de allerede kendte metoder til tilvejebringelse af glucose-isomerase kombinerer producentstammen sjældent høj glucoseisomerase-aktivitet med et gunstigt temperatur- og pH-optimum for enzymet. En lavere isomeriseringstemperatur end 60-65°C medfører fare for mikrobiel forurening af den reaktor, hvori isomeriseringen udføres. En forøgelse af temperaturen til 90°C nedsætter enzymets stabilitet, forårsager farvning af siruppen samt nogen ændring af viskositeten. Hvad angår industriel anvendelse er det mest gunstige pH-område fra 6,5 til 7,0, fordi der ved en pH-værdi på over 7,0 sker en alkalisk isomerisering af glucose under dannelse af D-psicose og farvning af

siruppen, og en lavere pH-værdi (under 5,5) bevirker en irreversibel denaturering af enzymet.

5 Det har nu vist sig, at en hidtil ukendt mikroorganismestamme *Streptomyces* sp. N. 1339 producerer glucoseisomerase i højt udbytte, samtidig med at den fundne glucoseisomerase har et højt temperatur-optimum og et gunstigt pH-optimum.

10 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved at der som mikroorganisme anvendes stammen *Streptomyces* sp. N. 1339 deponeret ved den bulgarske stats Institut for Lægemiddelkontrol (Institute for Drugs Control), under nummeret 144.

15 *Streptomyces*-stamme sp. N.1339 er blevet isoleret fra bulgarsk jord. 874 *Streptomyces*-stammer er blevet undersøgt for produktion af glucoseisomerase. Undersøgelsen er blevet udført på det modificerede syntetiske kulturmedium N.1 efter Krasilnikov, idet selektionen er blevet gennemført på to substratniveauer under anvendelse af xylose og xylan. Under disse betingelser er der fundet 18 *Streptomyces*-stammer, som kan udvikle og producere enzymet glucoseisomerase. Af disse *Streptomyces*-stammer viser sp. N.1339 sig at have de største
20 perspektiver med hensyn til industriel anvendelse. Stammen har været i kollektionen ved The State Institute for Drugs Control, bul. Vladimir Zaimov N.26 siden 29. sept. 1979 under nummeret 144 og har følgende morfologiske og biokemiske egenskaber. På kulturmedium 1 med nitrogenmineralkilde (ifølge G.F.Gause et al.) har kolonierne sædvanligvis en oval form, med uformede rande, flade med konvekse
25 kuppellignende centre og er let foldede i nogle tilfælde radialt segmenterede. Sporangierne er spiralformede med ikke over 1-3 vindinger. På nogle kulturmedier dannes coremier. Væksten er god. Sporerne har en længde på 0,4-0,9 micron og en bredde på 0,3-0,6
30 micron. Enderne har velaftgrænsede hjørner. I nogle tilfælde har sporerne en svagt konkav midte. De dannes ved fragmentering.

Farven af luft- og substratmyceliet bestemmes ifølge A.S.Bondartsev's farveskala og Tresner-Backus-skalaen.

35 Med forskelligt kulturmedium skifter farven af luftmyceliet fra let grå til mørk grå (a^4 - a^2) afhængigt af carbon- og nitrogenkilderne. På kulturmedium 1 med en uorganisk nitrogenkilde (ifølge G.F.Gause et al.) er farven musegrå (a^4) til mørkegrå (a^2), og på kulturmedium 2 med en organisk nitrogenkilde (ifølge G.F.Gause) er farven mørkegrå (a^2). På kulturmedier med forskellige carbon- og

nitrogenkilder er luftmyceliet gråt til mørkegråt.

På kulturmedium 1 med en mineralsk nitrogenkilde (ifølge G.F. Gause et al.) har substratmyceliet en lys citrongul farve til gul-orange (d^5-d^2). På kulturmedium 2 med en organisk nitrogenkilde (ifølge G.F.Gause et al.) er substratmyceliet gyldent-gult og bliver efter en forlænget dyrkningsperiode næsten kastaniebrunt (m^7-o^7).

På kulturmedier med forskellige carbon- og nitrogenkilder er substratmyceliet fra gult til gulgråt-grønt.

På kulturmedium kød-pepton-agar. Lav vækst. Luftmycelium hvidt, meget sparsomt. Substratmycelium: farveløst.

På kulturmedium kartoffel-glucose-agar. Vækst meget god. Luftmycelium gråt til mørkegråt. Substratmycelium lysebrunt til mørkebrunt, på randen af kolonien: gult. Pigment i centrum gult.

På kulturmedium Tchapek med sucrose. Middel vækst. Luftmycelium lysegråt. Substratmycelium beige.

På kulturmedium Tchapek med glucose. Middel vækst. Luftmycelium gråligt. Substratmycelium cremefarvet.

På kulturmedium med sucrose. God vækst. Luftmycelium gråt. Substratmycelium gult.

På kulturmedium amyllum-agar. Middel vækst. Luftmycelium lysegråt, med bleg askegrå farve. Substratmycelium gult, citrongult.

På amyllum-ammoniak kulturmedium ifølge Mishustin. God vækst. Luftmycelium gråt til mørkegråt. Substratmycelium gult, lysegult.

På syntetisk medium ifølge Krassilnikov. Vækst lav til middel. Luftmycelium beige-gråt. Substratmycelium gult.

På CPI ifølge N.A.Krassilnikov. God vækst. Luftmycelium mælkegråt, blågråt. Substratmycelium gul-gråligt-grønt.

På CPII ifølge N.A.Krassilnikov. God vækst. Luftmycelium gråt, hvidt ekssudat udskilles. Substratmycelium creme-gråt.

På CPIII ifølge Krassilnikov. God vækst. Luftmycelium gråt. Substratmycelium gult, citronfarvet.

På CPIV ifølge N.A.Krassilnikov. Middel vækst. Luftmycelium lysegråt, gråligt. Substratmycelium cremefarvet.

På CPV ifølge N.A.Krassilnikov. Lav vækst. Luftmycelium hvidt. Substratmycelium beige, mørk cremefarvet.

På syntetisk medium ifølge Vaxman. Middel vækst. Luftmycelium hvidt, på separate dele gråt. Substratmycelium gult til orange.

På kød-amyllum-agar. Middel vækst. Luftmycelium gråt.

Substratmycelium gult.

På pepton-agar. God vækst. Luftmycelium gråt til mørkegråt. Substratmycelium farveløst med en skygge af luftmycelium.

5 På glucose-asparagin-agar. Middel vækst. Luftmycelium lysegråt. Substratmycelium gult-cremefarvet.

På glycerin-asparagin-agar. God vækst. Luftmycelium lysegråt, idet det bliver gråt ved ældning. Substratmycelium mørkegult.

10 På tyrosin-agar. Middel vækst. Luftmycelium gråt, i nogle kolonier gråliggult. Substratmycelium mørkegult til orange.

På tyrosin-casein-nitrat agar. Middel vækst. Luftmycelium askegråt. Substratmycelium gult.

På glucose-tyrosin-agar. God vækst. Luftmycelium creme-gråt til gråt. Substratmycelium gulbrunt.

15 På saccharose-nitrat-agar. Middel vækst. Luftmycelium gråt. Substratmycelium creme-gult.

På glycerol-calcium-malat-agar. God vækst. Luftmycelium lysegråt til gråt. Substratmycelium gulorange.

20 På pepton-oksekød-agar. God vækst. Luftmycelium gråt. Substratmycelium farveløst til beige.

På havre-agar. Vækst meget god. Luftmycelium gråt. Substratmycelium lysegult.

På tomat-agar. God vækst. Luftmycelium mørkegråt. Substratmycelium terracottafarvet.

25 På blyacetat-agar. Lav vækst. Luftmycelium gråligt. Substratmycelium gul-brunt.

På jern-pepton-agar. Middel vækst. Luftmycelium lysegråt. Substratmycelium farveløst med en grå skygge af luftmycelium.

30 På gær-malt-agar. God vækst. Luftmycelium gråt. Substratmycelium orange.

Over for NaCl i mediet er stammens tolerance lav. Maximumkoncentrationen er 4%. Ved denne koncentration er væksten af stammen lav. Luftmycelium er hvidt. Substratmycelium gult. En koncentration på over 1% har en negativ indflydelse på sporuleringsgraden.

35 Stammen peptoniserer fedtfattig mælk. I begyndelsen af peptoniseringen er reaktionen sur, men efter nogen tid bliver den alkalisk.

Den smelter gelatine. Den vokser meget godt på et sucrosemedium, men inverterer ikke sucrose. Den vokser meget godt på en amylaseagar,

og den hydrolyserer stivelse godt.

Den dekomponerer ikke cellulose og reducerer ikke nitrater til nitriter. Den frigør hydrogensulfid. Den vokser på kartofler.

5 Hæmolyse positiv. Tyrosinase negativ.

Det er blevet konstateret, at på Pridham og Gottlieb's basale kulturmedium er væksten god i nærværelse af følgende carbonkilder: glucose, fructose, lævulose, xylose, maltose, cellobiose, galactose, mannitol, arabinose, dextrose, ribose og glycerol.

10 Stammen absorberer salicin i mindre målestok.

Den absorberer ikke carbonkilderne lactose, sorbit, inosit, sucrose og raffinose.

Der forekommer nogle forskelle i pigmenteringen af luft- og substratmyceliet afhængigt af carbonkilden.

15 Det er blevet konstateret, at på Pridham og Gottlieb's modificerede basale kulturmedium er stammens vækst god i nærværelse af følgende nitrogenkilder: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 og carbamid.

20 Væksten er moderat på et vækstmedium med NaNO_3 . Stammen vokser ikke på et vækstmedium med NaNO_2 .

Meget god vækst af stammen er iagttaget på vækstmedier med følgende aminosyrer: asparaginsyre, asparagin, prolin, cystin, tyrosin. Væksten er moderat på et vækstmedium med valin, hydroxyprolin, phenylalanin, leucin og alanin. Stammen vokser ikke på et vækstmedium med glutaminsyre.

25 Afhængigt af nitrogenkilden observeres nogle forskelle i pigmenteringen af luft- og substratmyceliet.

Ifølge nogle egenskaber ligner *Streptomyces*-stammen N. 1339 *Streptomyces griseoflavus*, der tilhører Gray-serierne ifølge Bergey's (1974), og *Actinomyces griseoflavus* af Flavus-gruppen ifølge N.A.Krassilnikov (1970). Sidstnævnte skelnes fra førstnævnte ved hjælp af et antal morfologiske, dyrkningsmæssige og fysiologisk, biokemiske egenskaber, der er beskrevet i art-karakteriseringen af Bergey's (1974) og N.A.Krassilnikov (1970). *Streptomyces griseoflavus* har f.eks. aflange stavlignende og ovale sporer med glat overflade; den viser tolerance over for NaCl fra 7 til 10%. Den hydrolyserer stivelse svagt. Den absorberer sucrose og sorbit og absorberer ikke galactose. Derfor er *Streptomyces*-stammen N.1339 ikke identisk med den lignende *Streptomyces griseoflavus* (*Actinomyces griseoflavus*).

Det er derfor, den betegnes *Streptomyces* sp. N.1339. Den tilhører Gray-serierne ifølge Bergey's (1974) og *Flavus*-gruppen ifølge N.A.Krassilnikov (1970).

5 Producentstammen kan dyrkes i 500 ml Erlenmeyer-kolber indeholdende 50 ml fermenteringsmedium i fra 36 til 96 timer ved en temperatur på fra 24 til 36°C, en begyndelses-pH-værdi på fra 6,5 til 9,0, på et rysteapparat med fra 180 til 320 omdr./min.

10 Isomerisering af glucose til fructose ved hjælp af glucoseisomerase fra stammen *Streptomyces* sp. N.1339 kan udføres ved en direkte behandling med frisk mycelium (adskilt ved centrifugering ved 12.000 omdr./min. og vasket tre gange med 0,05M fosfatpuffer med pH 7,0) eller med tørret mycelium (lufttørrede eller acetonetørrede celler), med enzymopløsning (opnået efter en
15 ultralyd-disintegration eller autolyse af cellemateriale og separation af supernatant ved centrifugering ved 15.000 omdr./min.), med kulturcentrifugat indeholdende extracellulær isomerase eller med celler, der er gjort immobile på en hård bærer.

20 Den fructose, der dannes i reaktionsblandingen, måles ifølge cystein-carbazol-metoden (18), og stammens aktivitet udtrykkes i mg fructose pr. ml kulturvæske eller i internationale glucoseisomerase-enheder (GIU). Én GIU er lig med den mængde enzym, der ved 70°C og pH 7,0, 1M glucose-opløsning i 0,05M fosfatbuffer, 1×10^{-4} M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ og 1×10^{-2} M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ på 1 minut omdanner 1 μmol glucose til 1 μmol
25 fructose.

Fordelene ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er følgende:

30 Til frembringelse af glucoseisomerase anvendes stammen *Streptomyces* sp. N.1339, der er i stand til at syntetisere en stor mængde af enzymet (12.000-20.000 GIU), hvilket er fra 4 til 20 gange mere end aktiviteten af de fra litteraturen kendte producentstammer (4-15). Det enzym, der opnås, er kendetegnet ved et højt temperaturoptimum (70°C) ved lave optimale Co^{++} -koncentrationer (1×10^{-4} M) og Mg^{++} -koncentrationer (1×10^{-2} M) i isomeriseringsblandingen. Det har et
35 gunstigt pH-optimum (7,0) og betragtelig termostabilitet mellem 40 og 65°C.

Opfindelsen illustreres ved følgende eksempel:

EKSEMPEL

Streptomyces N.1339 holdes i reagensglas med skråagar på vækstmedier med følgende sammensætning:

- 5 1. Xylose-vækstmedium
xylose 20 g
agar 20 g
KNO₃ 1,0 g
K₂HPO₄ 0,5 g
10 MgSO₄·7H₂O 0,5 g
NaCl 0,5 g
CaCO₃ 1,0 g
FeSO₄ 0,001 g
vand til 1 liter.
- 15 2. Kartoffel-glucoseagar
kartoffelekstrakt fra 300 g kogte kartofler
glucose 10 g
agar 20 g
20 vand til 2 liter.

Det anbefales, at der til opretholdelse af stammen skiftevis anvendes begge vækstmedier.

- 25 Til et velspiret materiale fra en 10-15 dage gammel kultur på vækstmedium 1 eller 2 (1 anbefales) tilsættes 6 ml inokuleringsvækstmedium, der har følgende sammensætning:

	xylose	1,0%
	tryptone	2,0%
30	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
	K ₂ HPO ₄	0,25%
	Vand op til	100%

- 35 Cellemassen udvaskes, og reagensglasset anbringes på et rysteapparat i 24 timer ved 30⁰C og 240 omdr./min. Fra den således adapterede kultur podes inokuleringsmedium med følgende sammensætning:

xylose	1,0%
majsekstrakt	3,0% (tørvægt)

	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1%
	K_2HPO_4	0,25%
	agar	0,1%
5	Vand op til	100%

Efter 60 timers dyrkning under de ovennævnte betingelser overføres 5% af inokulum til et fermenteringsvækstmedium med følgende sammensætning:

10	xylose	1% af fermenteringsmediets vægt
	majsekstrakt	3,0% (tørvægt) af fermenteringsmediets vægt
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1% af fermenteringsmediets vægt
	KCl	0,0075% af fermenteringsmediets vægt
15	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,024% af fermenteringsmediets vægt
	Vand op til	100%

Dyrkningen udføres i 500 ml Erlenmeyer-kolber indeholdende 50 ml fermenteringsmedium. Dyrkningen udføres i 60 timer ved 30°C på et rysteapparat ved 240 omdr./min. Begyndelses-pH-værdien er 8,5.

Efter 60 timers dyrkning af *Streptomyces* sp. N.1339 opnås fra 140 til 220 g fugtig biomasse pr. 1 liter dyrkningsvæske.

Isomeriseringen af glucose til fructose ved hjælp af glucoseisomerase fra stammen *Streptomyces* sp. N.1339 udføres ved en temperatur på 70°C, en pH-værdi på 7,0 i nærværelse af $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i en koncentration på $1 \times 10^{-4}\text{M}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i en koncentration på $1 \times 10^{-2}\text{M}$ og en substratkoncentration på 1M.

Aktiviteten af stammen *Streptomyces* sp. N.1339 er 130-215 mg fructose pr. 1 ml dyrkningsvæske eller 12.000-20.000 GIU pr. 1 liter kulturvæske.

REFERENCER

1. Gratcheva, I.M., Mositchev, M.S., Gavristov, A.B., Filippov, S.A., 1977. Aut.cert.SSSR, No.542763. Bull."Otkritie, izobretenia"N.2.
2. Patent No. 1.361.846, England.
3. Patent No. 3.956.066, USA
4. Patent No. 3.616.221, USA
5. Patent No. 3.834.988, USA

6. Patent No. 1.451.273, England
7. Patent No. 1.376.787, England
8. Patent No. 1.284.218, England
- 5 9. Patent No. 534.490, SSSR
10. Patent No. 534.491, SSSR
11. Patent No. 542.763, SSSR
12. Patent No. 2.219.713, BRD
13. Patent No. 2.247.922, BRD
- 10 14. Patent No. 2.018.518, BRD
15. Patent No. 1.934.461, BRD
16. Patent No. 2.223.340, BRD
17. Patent No. 2.131.984, Frankrig
18. Dische, Z., Borenfreund, E., 1951, J.Biol.Chem., 192, 583.
- 15 19. Heady, R.E., Jacaway, W.A., Patent No.2225864, BRD
20. Horwath, R.O., Cole, G.W., 1973. Patent No.2156622, Frankrig
21. Horwath, R.O., Cole, G.W., 1973. Patent No.2247922, BRD
22. Hsu, T.Y., Shon, S.C., 1964. Sheng Wu Hua Usuen Yu Sheng Wu
Li Hsuen Pao, 4, 342.
- 20 23. Iizuka, H., Ayukawa, Y., Suekane, M., Kanno, M., 1971. Patent
No.3622463, USA
24. Kent, C.A., Emery, A.N., 1973, J.Appl.Chem. and Biotechnol.,
23, 689.
25. Kooi, E.R., Smyth, R.J., 1972, Food Technol., 26, 9, 57.
- 25 26. Lee, C.K., Lawrence, E.N., Long, M.E., 1972. Patent No.
3645848, USA
27. Liyd, N.E., Lewis, L.T., Logan, R.M., Patel, D.N., 1972. Patent
No.3694314, USA
28. Marschall, R.O., Kooi, E.R., 1957. Science, 125, No.3249,648
- 30 29. Scallet, B.L., Shieh, K., Ehrenthan, I., 1974, Stärke, 26, 12, 405
30. Shieh, K.K., Lee, H.A., Donnelly, B.J., 1974. Patent No.
3834988, USA
31. Skot, G., Outtrup, H. In "5th Int.Ferment.Symp., 4th Int.Spec.
Sym.Yeast, Berlin, 1976, Abstr.Pap." - Berlin, 1976, 256.
- 35 32. Strandberg, J.W., Smily, K.L., 1971. Appl.Microbiol., 21, 4, 588.
33. Takasaki, Y. Patent No.49981, Japan
34. Takasaki, Y., 1971. Patent No. 3616221, USA
35. Takasaki, Y., 1975. Patent No.50-17560, Japan
36. Tsumura, M., Sato, T. 1965, Agr.Biol.Chem., 29, 1129.

P a t e n t k r a v .

5 1. Fremgangsmåde til fremstilling af glucoseisomerase ved
dyrkning af en stamme af slægten *Streptomyces* ved en temperatur på
24-36°C i et næringsmedium med en begyndelses-pH-værdi mellem 6,5 og
9,0 og indeholdende xylose, k e n d e t e g n e t ved, at der som
mikroorganisme anvendes stammen *Streptomyces* sp. N. 1339 deponeret
ved den bulgarske stats Institut for Lægemiddelkontrol (Institute for
10 Drugs Control), under nummeret 144.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
det anvendte vækstmedium har følgende sammensætning:

xylose	1,0-2,0% af vækstmediets vægt
15 majsekstrakt	1,5-4,0% (tørvægt) af vækstmediets vægt
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05-0,2% af vækstmediets vægt
KCl	0,005-0,01% af vækstmediets vægt
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,008-0,036% af vækstmediets vægt
Vand op til	100%

20

25

30

35