



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 655 230 A5

⑤① Int. Cl.4: A 24 B 15/20

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 5573/79

㉒ Anmeldungsdatum: 14.06.1979

③⑩ Priorität(en): 15.06.1978 US 916322

㉔ Patent erteilt: 15.04.1986

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.04.1986

⑦③ Inhaber:
Brown & Williamson Tobacco Corporation,
Louisville/KY (US)

⑦② Erfinder:
Gravely, Lawrence Edmond, Louisville/KY (US)
Geiss, Vernon Louis, Georgetown/IN (US)
Gregory, Charles Fred, Middletown/KY (US)

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Dr.-Ing. Hans A. Troesch und
Dipl.-Ing. Jacques J. Troesch, Zürich

⑤④ **Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotingehaltes von Tabak.**

⑤⑦ Es soll ein Verfahren zum Behandeln von Tabak geschaffen werden, um dessen Nitrat- und Nikotingehalte zu verringern, welcher Tabak, wenn einem Tabakprodukt zugemischt, den Rauch des Produktes mit geringerem Stickoxid, Wasserstoffzyanid und Nikotin beaufschlagt und dies ohne Verlust von wünschbaren Geschmacks- und Geruchseigenschaften oder anderen Rauchercharakteristiken. Bei diesem Verfahren wird Tabak unter gesteuerten Bedingungen dem Einfluss eines Mikroorganismus ausgesetzt, um dem Tabak Nitrate und Alkaloide (Nikotin) durch biochemische Reaktion abzubauen. Der Mikroorganismus wird in Anwesenheit einer relativ geringen Menge einer Nitrat enthaltenden Verbindung kombiniert oder gezüchtet. Auf diese Weise behandelte Tabak weist einen verringerten Nitrat- und Nikotingehalt auf. Wenn derart behandelte Tabak einem Tabakraucherprodukt zugesetzt wird, erzeugt dieses einen milden Rauch, welcher eine reduzierte Menge an Stickoxid, Wasserstoffzyanid und Nikotin enthält. Es entsteht indes kein merklicher Verlust an gewünschtem Geruch, Geschmack und Rauchereigenschaften.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak, gekennzeichnet entweder durch die fol-
 genden Verfahrensschritte:

a) Zusammenbringen von Tabak mit einem wässrigen
 Medium, welches Mikroorganismen enthält, die Nitrat und
 Nikotin des Tabaks abzubauen in der Lage sind, und

b) Belassen dieses Tabaks unter der Einwirkung der Mi-
 kroorganismen während ungefähr 18 Std. und bei einer
 Temperatur zwischen 20 und 40 °C,
 oder durch die Schritte:

aa) Mischen des Tabaks in einer wässrigen Lösung,

ab) Entfernen des Tabaks aus der wässrigen Lösung,

wobei eine Tabakextraktbrühe zurückbleibt,

ac) Zusetzen von Cellulomonas sp. zur Brühe,

ad) Inkubieren der Cellulomonas sp.,

ae) Zusetzen der inkubierten Cellulomonas sp. in dieser
 Brühe zum Tabak,

oder die Schritte:

ba) Mischen von Tabak in einer wässrigen Lösung,

bb) Entfernen des Tabaks aus der wässrigen Lösung,
 wobei eine Tabak-Extraktbrühe zurückbleibt,

bc) Abfiltrieren der Tabak-Extraktbrühe durch eine se-
 mipermeeable Membrane, um einen ersten Rückstand zu-
 rückzuhalten und den Durchgang von vorbestimmten Ex-
 trakt-Komponenten zur Bildung eines ersten Durchgangs zu
 sichern, und

bd) dass man dieses erste Durchgangsprodukt mit Cellu-
 lomonas sp. behandelt, um Nitrat und Nikotin abzubauen.

2. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

a) Zusammenbringen von Tabak mit einem wässrigen
 Medium, welches Mikroorganismen enthält, die Nitrat und
 Nikotin des Tabaks abzubauen in der Lage sind, und

b) Belassen dieses Tabaks unter der Einwirkung der Mi-
 kroorganismen während ungefähr 18 Std. und bei einer
 Temperatur zwischen 20 und 40°,
 nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das wässrige
 Medium eine nitratenthaltende Verbindung aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
 dass diese Nitratverbindung aus der Gruppe Kaliumnitrat,
 Natriumnitrat oder Ammoniumnitrat gewählt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
 dass die Nitratverbindung 0,1 bis 1,0 Gew.% des wässrigen
 Mediums beträgt.

5. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

a) Zusammenbringen von Tabak mit einem wässrigen
 Medium, welches Mikroorganismen enthält, die Nitrat und
 Nikotin des Tabaks abzubauen in der Lage sind, und

b) Belassen dieses Tabaks unter der Einwirkung der Mi-
 kroorganismen während ungefähr 18 Std. und bei einer
 Temperatur zwischen 20 und 40 °C,
 nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mi-
 kroorganismen Cellulomonas sp. sind.

6. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

a) Zusammenbringen von Tabak mit einem wässrigen
 Medium, welches Mikroorganismen enthält, die Nitrat und
 Nikotin des Tabaks abzubauen in der Lage sind, und

b) Belassen dieses Tabaks unter der Einwirkung der Mi-
 kroorganismen während ungefähr 18 Std. und bei einer
 Temperatur zwischen 20 und 40 °C,
 nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass dieser mi-
 krobiologische Einfluss bei einem pH-Wert von 7,0 bis 9,5
 erfolgt.

7. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

a) Zusammenbringen von Tabak mit einem wässrigen
 Medium, welches Mikroorganismen enthält, die Nitrat und
 Nikotin des Tabaks abzubauen in der Lage sind, und

b) Belassen dieses Tabaks unter der Einwirkung der Mi-
 kroorganismen während ungefähr 18 Std. und bei einer
 Temperatur zwischen 20 und 40 °C,
 nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man den
 Tabak mit diesen Mikroorganismen in Abwesenheit von
 freiem Sauerstoff hält.

8. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

a) Zusammenbringen von Tabak mit einem wässrigen
 Medium, welches Mikroorganismen enthält, die Nitrat und
 Nikotin des Tabaks abzubauen in der Lage sind, und

b) Belassen dieses Tabaks unter der Einwirkung der Mi-
 kroorganismen während ungefähr 18 Std. und bei einer
 Temperatur zwischen 20 und 40 °C,
 nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man den
 Tabak mit den Mikroorganismen in Anwesenheit von Sauer-
 stoff hält.

9. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

aa) Mischen des Tabaks in einer wässrigen Lösung,

ab) Entfernen des Tabaks aus der wässrigen Lösung,

wobei eine Tabakextraktbrühe zurückbleibt,

ac) Zusetzen von Cellulomonas sp. zur Brühe,

ad) Inkubieren der Cellulomonas sp.,

ae) Zusetzen der inkubierten Cellulomonas sp. in dieser
 Brühe zum Tabak,

nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässri-
 ge Lösung Wasser ist.

10. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

aa) Mischen des Tabaks in einer wässrigen Lösung,

ab) Entfernen des Tabaks aus der wässrigen Lösung,
 wobei eine Tabakextraktbrühe zurückbleibt,

ac) Zusetzen von Cellulomonas sp. zur Brühe,

ad) Inkubieren der Cellulomonas sp.,

ae) Zusetzen der inkubierten Cellulomonas sp. in dieser
 Brühe zum Tabak,

nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Brühe
 nach dem Schritt (ab) sterilisiert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeich-
 net, dass das Sterilisieren während mindestens 15 min bei ei-
 nem Druck von mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und ei-
 ner Temperatur von mindestens 121 °C erfolgt.

12. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten.

aa) Mischen des Tabaks in einer wässrigen Lösung,

ab) Entfernen des Tabaks aus der wässrigen Lösung,
 wobei eine Tabakextraktbrühe zurückbleibt,

ac) Zusetzen von Cellulomonas sp. zur Brühe,

ad) Inkubieren der Cellulomonas sp.,

ae) Zusetzen der inkubierten Cellulomonas sp. in dieser
 Brühe zum Tabak,

nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass vor der Zu-
 gabe der Cellulomonas sp. Hefeextrakt zur Brühe gegeben
 wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeich-
 net, dass der Hefeextrakt in einer Menge von 0,1 bis 2,0
 Gew.% dieser Brühe beigegeben wird.

14. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotin-
 gehaltenes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

aa) Mischen des Tabaks in einer wässrigen Lösung,

ab) Entfernen des Tabaks aus der wässrigen Lösung,
 wobei eine Tabakextraktbrühe zurückbleibt,

ac) Zusetzen von Cellulomonas sp. zur Brühe,

ad) Inkubieren der Cellulomonas sp..

ae) Zusetzen der inkubierten *Cellulomonas* sp. in dieser Brühe zum Tabak, nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Inkubieren ein Bewegen der Lösung umfasst.

15. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotingehaltes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

- aa) Mischen des Tabaks in einer wässrigen Lösung,
- ab) Entfernen des Tabaks aus der wässrigen Lösung, wobei eine Tabakextraktbrühe zurückbleibt,
- ac) Zusetzen von *Cellulomonas* sp. zur Brühe,
- ad) Inkubieren der *Cellulomonas* sp.,
- ae) Zusetzen der inkubierten *Cellulomonas* sp. in dieser Brühe zum Tabak,

nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Brühe vor der Zugabe von *Cellulomonas* sp. zwischen 7,0 und 9,5 eingestellt wird.

16. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotingehaltes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

- ba) Mischen von Tabak in einer wässrigen Lösung,
- bb) Entfernen des Tabaks aus der wässrigen Lösung, wobei eine Tabak-Extraktbrühe zurückbleibt,
- bc) Abfiltrieren der Tabak-Extraktbrühe durch eine semipermeable Membrane, um einen ersten Rückstand zurückzuhalten und den Durchgang von vorbestimmten Extrakt-Komponenten zur Bildung eines ersten Durchgangs zu sichern, und

bd) dass man dieses erste Durchgangsprodukt mit *Cellulomonas* sp. behandelt, um Nitrat und Nikotin abzubauen, nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

e) dass man das erste, behandelte Durchgangsprodukt durch eine weitere semipermeable Membran filtert, um davon einen zweiten Anteil, welcher die *Cellulomonas* sp. einschliesst, zurückzuhalten und den Rest durch die Membrane durchgehen zu lassen, um ein zweites Durchgangsprodukt zu geben,

f) dass man dieses zweite Durchgangsprodukt mit dem ersten zurückgehaltenen Produkt mischt und

g) dass man die Mischung aus dem zweiten durchgegangenen und dem ersten zurückgehaltenen Produkt dem in Schritt (bb) abgeschiedenen Tabak zumischt.

17. Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotingehaltes von Tabak mit den folgenden Verfahrensschritten:

- a) Zusammenbringen von Tabak mit einem wässrigen Medium, welches Mikroorganismen enthält, die Nitrat und Nikotin des Tabaks abzubauen in der Lage sind, und
- b) Belassen dieses Tabaks unter der Einwirkung der Mikroorganismen während ungefähr 18 Std. und bei einer Temperatur zwischen 20 und 40 °C, nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das wässrige Medium auf folgende Weise hergestellt wird:

a) Man mischt mindestens 5 Gew.% Nähragar mit Wasser, um eine erste Lösung zu erhalten,

b) man gibt dieser ersten Lösung 0,1 bis 1,0 Gew.% einer Nitrat enthaltenden Verbindung bei,

c) man sterilisiert diese erste Lösung, indem man sie bei mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck bei 121 °C oder mehr während einer Zeitdauer von mindestens 15 min sterilisiert,

d) man gibt diesem sterilisierten Medium *Cellulomonas* sp. bei und züchtet diese während einer Zeit von 3 bis 5 Tagen bei 20 bis 40 °C und

e) man entfernt die so erhaltene Kolonie oder Kultur vom Nährboden-Nitratmedium.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man das Sterilisieren des ersten Mediums in einem geeigneten Teströhrchen durchführt, wobei die geeignete Oberfläche des Mediums als Kulturzuchtfläche dient.

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man eine erste Tabakextraktbrühe wie folgt erzeugt:

a) Zusetzen von Tabak in Wasser, um eine zweite Lösung zu bilden,

b) Kochen dieser zweiten Lösung in einem Gefäss während mindestens 40 min bei mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und einer Temperatur von mindestens 121 °C,

c) Ergänzen der zweiten, gekochten Lösung mit Wasser, ungefähr auf das ursprüngliche Volumen,

d) Zumischen von Hefeextrakt in der Menge von 0,1 bis 2 Gew.% pro Volumenextrakt,

e) Sterilisieren der zweiten Lösung während mindestens 15 min bei mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck bei einer Temperatur von mindestens 121 °C und

f) Zusetzen der resultierenden Kultur vom Agarnitratboden zu dieser zweiten sterilisierten Lösung.

20. Verfahren zum Herstellen eines mikrobiologischen Mediums zur Verwendung im Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1–16 zwecks eines Simultan-Abbaues von Nitrat und Nikotin in einer zu behandelnden Substanz, dadurch gekennzeichnet, dass es durch folgende Schritte hergestellt wird:

a) Mischen von mindestens 5 Gew.-% Nähragar mit Wasser zu einer ersten Lösung,

b) Zusetzen von 0,5 bis 1 Gew.% einer nitratenthaltenen Verbindung in diese erste Lösung,

c) Sterilisieren dieser ersten Lösung, indem man sie bei mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und mindestens 15 min behandelt,

d) Zusetzen von *Cellulomonas* sp. in diese erste Lösung, Belassen während einer Inkubationszeit von 3 bis 5 Tagen bei einer Temperatur von 20 bis 40 °C.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Nitrat enthaltende Verbindung Kaliumnitrat ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Sterilisation des ersten Mediums in einem geeigneten Teströhrchen erfolgt, und dass man die geeignete Oberfläche des Mediums als Impffläche benützt.

23. Tabak, hergestellt nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1–19.

45

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herabsetzen des Nitrat- und Nikotingehaltes von Tabak.

Es ist aus unterschiedlichen Gründen oftmals wünschbar, den Nitrat- und Nikotingehalt von Tabak zu verringern. So wurden in den letzten Jahren Zigaretten mit niedrigem Nikotingehalt vom Verbraucher immer häufiger akzeptiert. Auch wurde die Nachfrage nach derartigen Zigaretten verstärkt und es kamen verschiedene Techniken zur Anwendung, um entweder den Nitrat- oder den Nikotingehalt von Tabak zu reduzieren.

Im Bestreben, den Nitratgehalt zu reduzieren, umfassten die bekanntesten Verfahren die Verwendung chemischer Stoffe, welche selektiv durch Ionenverzögerungstechniken Nitrat aus Tabakextrakten entfernen. Die Herabsetzung des Nikotingehaltes von Tabak wurde sowohl durch chemische Mittel als auch durch mikrobielle Behandlung erreicht. US-PS 4 011 141, US-PS 4 038 993 und US-PS 4 038 993 lehren mikrobielle Behandlungsmittel für die Herabsetzung des Nikotingehaltes von Tabak. Es ist indessen kein Behandlungsverfahren bekannt geworden, welches selektiv gleichzeitig

die Verringerung, sowohl von Nitrat als auch von Nikotin im Tabak in einem Behandlungsverfahren offenbart, ohne dabei alle Aromakomponenten zu verringern, insbesondere eines, welches die Verwendung von Mikroorganismen einschliesst.

Es soll ein Verfahren zum Behandeln von Tabak geschaffen werden, um dessen Nitrat- und Nikotingehalte zu verringern, welcher Tabak, wenn einem Tabakprodukt zuge-mischt, den Rauch des Produkts mit geringerem Stickoxid, Wasserstoffzyanid und Nikotin beaufschlagt und dies ohne Verlust von wünschbaren Geschmacks- und Geruchseigenschaften oder anderen Raucher-Charakteristiken.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, welches durch den kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 offenbart wird. Die Erfindung wird anschliessend beispielsweise erläutert. Dabei zeigt die Figur einen Verfahrensablauf.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, dass gewisse Mikroorganismen in wässriger Lösung Nitrat und Nikotin des Tabakes abbauen, wenn sie mit Tabak in Berührung kommen. Es wurde festgestellt, dass in Tabak, welcher mit einer reinen Kultur eines in einem Nitrat enthaltendem Medium gewachsenen Mikroorganismus geimpft wird, sowohl Nitrat als auch Alkaloide (Nikotin) gleichzeitig abgebaut werden. Dabei wird ein Tabak erhalten, welcher, wenn er in eine Zigarettenmischung von Tabaken beigefügt wird, dazu beiträgt, die Abgabe von Stickoxiden, Wasserstoffzyanid und Nikotin herabzusetzen. Die Kultur ist *Cellulomonas sp.*, die in der US-PS 4 038 993 beschrieben ist. Es ist dort auch eine vorzugsweise Nitrat enthaltende Verbindung, die dem Nährboden beigegeben wird, nämlich Kaliumnitrat, beschrieben. Es ist indessen auch möglich, andere Kulturen und andere Nitrat enthaltende Verbindungen, wie Natriumnitrat, Ammoniumnitrat u. dgl. zu verwenden.

Wenn eine Kultur gemäss der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist es praktisch, Tabakblätter oder -stengel zu behandeln, und Nitrat und Nikotin gleichzeitig abzubauen oder einen Wasserextrakt von beiden Stoffen herzustellen, Nitrat und Nikotin abzubauen und den behandelten Extrakt auf ursprünglichen Tabak oder einen rekonstituierten Tabak einwirken zu lassen. Die Fähigkeit, den Extrakt zu behandeln und ihn dann wiederum auf den Originaltabak einwirken zu lassen, vermeidet die löslichen Gewichtsverluste, welche bei der Verwendung der Wasserextraktion und von Endlaugung als Mittel, um Nitrat und Nikotin abzubauen, auftreten. Dieses Vorgehen vermeidet auch den Verlust anderer wünschbarer Tabakkomponenten, welche bei der Wasserextraktion und in Abfällen zu finden sind.

Das Verfahren gemäss der vorliegenden Erfindung bietet ferner die Möglichkeit, beide Stoffe, d. h. sowohl Nitrat als Nikotin in rekonstituierten Tabak-Herstellungsanlagen abzubauen, in welchen der Tabak extrahiert und der Extrakt in nachfolgenden Verfahrensschritten zurückgeführt wird, da dieses Enzym- (mikrobiale) System in einem Flüssigkeitssystem sehr wirksam ist. Im Verfahren wird das Nitrat abgebaut und in gasförmigen Stickstoff übergeführt, welcher in die Atmosphäre abgelassen wird. Es wurde festgestellt, dass der pH-Wert des wässrigen Mediums, welches die Mikroorganismen vor der Zugabe des Tabakmaterials enthält, im Bereich von über 5,6 gehalten werden muss, um einen erfolgreich gleichzeitig Nitrate und Nikotin abbauenden Mikroorganismus zu ergeben. Der vorzugsweise pH-Ausgangswert der wässrigen Lösung ist ungefähr 7–9,5. Es wurde auch festgestellt, dass die Nitrat enthaltende Verbindung im wässrigen Medium mindestens 0,1 Gew.%, vorzugsweise ungefähr 1 Gew.% sein muss. Obschon höhere %-Zahlen von Nitrat enthaltendem Material anwendbar sein können, bringen steigende Mengen von z. B. über 1 Gew.% keine merkliche Verbesserung im Abbauprozess der Mikroorganismen,

obschon höhere Konzentrationen verwendet werden und die Kultur in der Lage ist, Nitratkomponenten bei höheren Konzentrationen abzubauen.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht ein vorzugsweises Verfahren zum gleichzeitigen Abbauen der Nitrat- und Nikotingehalte von Tabak im Herstellen eines wässrigen Mediums, welches Mikroorganismen enthält.

Bei der Herstellung eines wässrigen Mediums wird eine Nähragar (Erst)-Lösung hergestellt, indem ein handelsübliches Nähragar destilliertem Wasser zugefügt wird, wobei die Menge Agar im allgemeinen mindestens 5 g/ltr beträgt. Dazu wird eine Nitrat enthaltende Verbindung beigegeben, vorzugsweise Kaliumnitrat im Verhältnis von mindestens 0,1 Bew.% Nitrat pro Volumen Wasser, im allgemeinen ungefähr 1 Gew.% von Nitrat pro Volumeneinheit Wasser. Diese Lösung wird dann in geeigneten Röhrchen sterilisiert. Es werden m. a. W. Reagenzröhrchen, sog. Teströhrchen, welche den Agarnährboden enthalten, geeignet sterilisiert, um eine geeignete Oberfläche des Nährbodens zu ergeben. Dies erfolgt in einem Autoklav während mindestens 15 min bei mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und bei mindestens 121°C . Der sterilisierte Nährboden wird dann in einem Kühlschrank zur späteren Verwendung gelagert. Dann wird eine zweite Lösung hergestellt, welche Nikotin und eine Nitrat enthaltende Verbindung enthält. Diese wird durch die auf dem sterilisierten Nährboden gezogenen Kulturen behandelt. Es kann eine nur Nitrate enthaltende Nährbrühe sein, welche durch Auflösung eines im Handel erhältlichen Nährproduktes in destilliertem Wasser erhalten wird, wobei die Menge des Nährmittels ungefähr 5–10 g pro ltr beträgt. Der Fachmann kann die Nährlösungskonzentration ändern, um zweckmässige Kulturen zu erhalten. Diese Lösung wird ebenfalls während mindestens 15 min bei mindestens $1,03 \pm 10^5$ Pa Überdruck und 121°C oder mehr in einem Autoklav sterilisiert. Kaliumnitrat oder andere Nitrat enthaltende Verbindungen können zu dieser Lösung beigegeben werden, bevor sie sterilisiert wird.

Ein anderes Beispiel einer zweiten Lösung ist eine Tabakextrakt-Kraftbrühe, welche sowohl Nitrate als auch Nikotin enthält. Die Tabakextraktbrühe wird hergestellt, indem normalerweise ungefähr 100 g Tabakmaterial, z. B. eine rauchgasbehandelte (geräucherte) Burley-Stengelmischung mit ungefähr 1000 ml Wasser gemischt wird und dann die Mischung in einem Autoklav während 30 bis 60 min bei mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und mindestens 121°C gekocht wird. Der sich ergebende Flüssigkeitsextrakt wird dann abgeschüttet und das Flüssigkeitsvolumen durch Zugabe von destilliertem Wasser auf die ursprüngliche Extraktmenge gebracht. Der Extrakt wird hierauf mit Hefeextrakt gemischt, wobei der Hefeextrakt im allgemeinen mindestens 0,3 Gew.% pro Volumen Flüssigkeit enthält. Es können indessen auch höhere Gehalte von Hefeextrakten verwendet werden. Die Mischung wird in Flaschen abgefüllt, mit Baumwoll-Wattebauschen verschlossen und während mindestens 15 min bei $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck oder höher und 121°C oder höher sterilisiert. Sie dient dem anschliessenden Züchten von Kulturen. Vor der Verwendung als Nährboden wird der pH-Wert mit entsprechender Säure- oder Basezugabe auf ungefähr 7,2 eingestellt.

Der Mikroorganismus, vorzugsweise *Cellulomonas sp.*, wird auf den Agar-Nährboden, welcher die nitratenthaltende Verbindung aufweist, geimpft und während 3–5 Tagen bei 20°C bis 40°C gehalten. Die dann gewachsene Kolonie wird zum Impfen der Tabakextraktbrühe verwendet, wobei der Impfstoff durch Waschen der geeigneten Nährbodenoberfläche mit einer vorbestimmten Menge sterilen, destillierten Wassers erhalten wird. Die Tabakextraktbrühe wird dann während im allgemeinen 24 Std. bei ungefähr $20\text{--}40^\circ\text{C}$ ge-

schüttelt, um das Wachstum der beigegebenen Mikroorganismen zu fördern. Kürzere oder längere Wachstumsperioden, bis ungefähr 48 Std., sind annehmbar.

Der daraus resultierende Impfstoff ist dann zum Behandeln einer zusätzlichen Tabakmenge gebrauchsfertig, um den Nitrat- und Nikotingehalt zu senken.

Die Erfindung wird anschliessend beispielsweise erläutert.

Beispiel 1

Das folgende Beispiel zeigt das Vorgehen beim Herstellen einer Impflösung.

(a) Agarnährboden + 1,0% Kaliumnitrat

Handelsüblich hergestellter Agarnährboden (in dehydrierter Form) von den Difco Laboratorien wurde zu destilliertem Wasser im Verhältnis von 23 g/lit zugegeben. Die 23 g des Agarnährstoffes enthielten 3 g Rindfleischextrakt, 5 g Pepton und 15 g Agar. Zu dieser Lösung wurde 1 Gew.% Kaliumnitrat pro Volumen Wasser zugegeben. Die erhaltene Lösung hatte einen End-pH-Wert von 6,8.

Dieses Produkt wurde dann in geeigneten Röhrchen in einem Autoklaven während 15 min bei $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und 121°C sterilisiert, anschliessend gekühlt und zum späteren Ziehen von Kulturen bereitgehalten.

(b) Nährbrühe

Es wurde eine Lösung einer Nährbrühe durch Beigabe von dehydratierter Nährbrühe von Difco Laboratorien in einer Menge von 8 g pro lit destilliertem Wasser hergestellt. Die Nährbrühe enthielt 5 g Pepton und 3 g Rindfleischextrakt. Die erhaltene wässrige Lösung wurde dann während 15 min bei $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und 121°C zwecks späteren Gebrauchs zum Herstellen von Kulturen sterilisiert.

(c) Rauchgasbehandelte Burley-Stengel-Tabakextraktbrühe

Eine rauchgasbehandelte Burley-Stengel-Tabakextraktbrü-

he wurde durch Beigabe von 100 g rauchgasbehandelten Burley-Stengeln zu 1000 ml Wasser hergestellt und in einem Autoklav für 40 min bei $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und 121°C gekocht. Der erhaltene Extrakt wurde abgeschüttet und das Flüssigkeitsvolumen mit destilliertem Wasser auf den ursprünglichen Ausgangswert gebracht. Die Flüssigkeit wurde dann mit Hefeextrakt im Verhältnis von 0,5 Gew.% Hefeextrakt pro Volumen Flüssigkeit gemischt und die Mischung in Flaschen abgefüllt, welche dann mit Wattebauschen verschlossen und während 15 min bei $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und 121°C als Nährboden für Kulturen sterilisiert wurde.

(d) Brüheimpfung

Die Mikroorganismen, *Cellulomonas* sp., werden auf die geneigte Oberfläche des Agarnährbodens aufgeimpft und während 3–5 Tagen bei 30°C belassen.

Das flüssige Medium, beispielsweise Nährlösung oder rauchgasbehandelte Burley-Stengel-Tabakextraktbrühe, wird mit einer aus der sterilen Wasserwaschung der Nährbodenoberfläche erhaltenen Brühe mit einer 2% (v/v) Rate inokuliert. Der pH-Wert der Brühe vor der Inokulation wird mit Salzsäure oder Natriumhydroxid auf einen Wert von 7,2 bis 7,5 eingestellt. Die Flaschen werden dann während 24 Std. bei 30°C und 220 Umdrehungen pro min rotiert.

Beispiel 2

Dieses Beispiel zeigt den Abbau von Nitrat und Nikotin, welcher sich bei Burley-Stengelextrakt und verschiedenen pH-Werten ergibt.

Ein wässriger Extrakt von Burley-Stengel wurde im Beispiel 1 wie vorbeschrieben angesetzt und in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 250 ml pro Flasche abgefüllt. Diese Medien wurden zum Bestimmen des Nitrat- und Nikotinabbaufähigkeits von *Cellulomonas* sp. verwendet.

Sie ergaben die anschliessend aufgeführten Resultate:

| Burley-Stengel-Extraktbrühe pH 7,2 | pH | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloid (Nikotin) (mg/ml) |
|---------------------------------------|------|----------------------------|-------------------------------|
| 0 Stunden | 7,18 | 220 | 0,32 |
| 7 Stunden | 7,08 | 80 | 0,04 |
| 25 Stunden | 7,75 | 0 | 0,02 |
| 30 Stunden | 8,15 | 0 | 0,02 |
| Burley-Stengel-Extraktbrühe pH 5,6 | | | |
| 0 Stunden | 5,60 | 295 | 0,41 |
| 7 Stunden | 5,59 | 305 | 0,39 |
| 25 Stunden | 5,65 | 265 | 0,39 |
| 30 Stunden | 5,70 | 300 | 0,37 |
| Burley-Stengel-Extraktbrühe pH 4,8 | | | |
| 0 Stunden | 4,82 | 305 | 0,41 |
| 7 Stunden | 4,85 | 310 | 0,42 |
| 25 Stunden | 4,90 | 285 | 0,40 |
| 30 Stunden | 4,80 | 300 | 0,40 |

Aus diesen Daten ergibt sich, dass *Cellulomonas* sp. bei einem pH von 7,2 den grössten Teil des Nitrats und Nikotins, welches im Extrakt vorhanden war, abbaute, während bei einem tieferen pH-Wert (5,6 und 4,8) ein sehr geringer, wenn überhaupt, Abbau stattfand.

Beispiel 3

Dieses Beispiel zeigt den Nitratabbau in andern Materialien als Tabak.

Cellulomonas sp. wurden unter den anschliessend erwähnten Bedingungen in einer Nährlösung mit 0,1% KNO₃

unter Verwendung einer New Brunswick Scientific Fermentor (MF214) gezogen. Die Impfkultur wurde analog dem Beispiel 1 unter Verwendung von Nähragar des Beispiels 1 (a) hergestellt. Die Wachstumsbedingungen waren folgende:
 Rühren (Umdrehungen pro min) – 300
 Belüftung (cc/min) – 4000
 Medium-Nährbrühe + 0,1% KNO₃ (Gewicht pro Volumen)
 Mediumvolumen (L) – 8
 Temperatur (°C) – 30
 pH – 7,0
 Impfstoffmenge (v/v) – 5%
 Impfzeit (Stunden) – 20
 Impfmedium – Nährbrühe + 0,1% KNO₃
 Schaumbrecher – p-1200 (Dow Chemical Company)
 pH-Prüfer – 2N HCl
 2N NaOH

Es ergaben sich die folgenden Wechsel im Nitratgehalt:

| Wachszeit (Stunden) | NO ₃ (µg/ml) | pH | Zellenzählung (× 10 ⁶) |
|----------------------|-------------------------|------|------------------------------------|
| Impfung | 138 | 7,70 | 4100 |
| 1 Std. nach Impfung | 126 | 6,90 | 53 |
| 2 Std. nach Impfung | 120 | 7,00 | 350 |
| 4 Std. nach Impfung | 114 | 7,20 | 1600 |
| 6 Std. nach Impfung | 108 | 7,20 | 1100 |
| 21 Std. nach Impfung | 132 | 7,18 | 3400 |
| 29 Std. nach Impfung | 0 | 7,05 | 3100 |
| 45 Std. nach Impfung | 0 | 7,55 | 4700 |

Es ergibt sich aus den vorstehenden Daten, dass Nitrat durch eine *Cellulomonas* sp. -Kultur in weniger als 29 Std. bei einem pH von 7,0–7,2 abgebaut war.

Beispiel 4

Dieses Beispiel zeigt den Nitrat- und Nikotinabbau, wie in Burley-Extraktbrühe mit einer relativ hohen Nitratkonzentration erfolgte.

| NO ₃ (µg/ml) | | pH | |
|-------------------------|------------|-----------|------------|
| 0 Stunden | 25 Stunden | 0 Stunden | 25 Stunden |
| Geimpft | | | |
| 355 | 155 | 6,97 | 8,17 |
| 500 | 240 | 7,00 | 7,95 |
| 3000 | 2370 | 6,95 | 8,05 |
| 4980 | 4560 | 6,92 | 8,15 |
| Testmessung Ungeimpft | | | |
| 460 | 400 | 6,99 | 7,19 |

Daraus ergibt sich, dass *Cellulomonas* sp. einen Teil der Nitrate bei allen Anfangs-Nitrat-Konzentrationen von 335 µg/ml bis 3000 µg/ml Nitrat in der Nährbrühe abbaute, sowie einen geringen Anteil der Nitrate über 4980 µg/ml. Der kleine Wechsel in der Testnitrat-Konzentration liegt nahe der analytischen Fehlergrenze. Es war dies aber keine mikrobielle Folge, da dem Testmedium keine Kultur beigegeben wurde.

Cellulomonas sp. wurde in einer New Brunswick Fermentor (MF 214) in Burley-Extraktbrühe gemäss Beispiel 1 (c) gezüchtet. Die Wachstumsbedingungen waren die gleichen wie im Beispiel 3, mit der Ausnahme, dass das Kulturren-Medium Burley-Extraktbrühe war. Die folgenden Änderungen traten im Nitrat- und Alkaloid-Gehalt auf:

| Wirkzeit/Stunden | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloid (Nikotin) (mg/ml) | pH |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|------|
| 10 Vor der Impfung | 4680 | 0,430 | 6,55 |
| Impfung | 0 | 0,028 | 8,14 |
| 15 Nach der Impfung | 4380 | 0,240 | 7,02 |
| 1 Std. nach der Impfung | 4500 | 0,202 | 6,90 |
| 2 Std. nach der Impfung | 4380 | 0,136 | 6,91 |
| 4 Std. nach der Impfung | 4200 | 0,036 | 7,18 |
| 6 Std. nach der Impfung | 2910 | 0,040 | 7,62 |
| 8 Std. nach der Impfung | 2040 | 0,038 | 7,57 |
| 20 9 Std. nach der Impfung | 2040 | 0,038 | 7,82 |
| 24 Std. nach der Impfung | 1350 | 0,040 | 7,20 |
| 26 Std. nach der Impfung | 1320 | 0,040 | 7,22 |
| 30 Std. nach der Impfung | 1380 | 0,036 | 7,21 |
| 48 Std. nach der Impfung | 900 | 0,034 | 7,05 |
| 25 50 Std. nach der Impfung | 900 | 0,034 | 7,00 |

Daraus ergibt sich, dass *Cellulomonas* sp. den grössten Teil des Nitrats und Nikotins, welchen im Extrakt vorhanden gewesen war, abbaute.

Beispiel 5

Dieses Beispiel demonstriert den Einfluss unterschiedlicher Mengen einer nitratenthaltenden Verbindung, welche zum Züchten eines Mikroorganismus für den Abbau von Nitraten verwendet werden kann.

Cellulomonas sp. wurde in einer nikotinfreien Nährbrühe (NB) + 0,1% KNO₃, wie in Beispiel 1 (b) erwähnt, hergestellt. Die Kultur wurde dazu verwendet, eine Nährbrühe mit unterschiedlichen Mengen KNO₃, welche auf einer Gewichts/Volumenbasis zugeführt wurden, zu impfen. Während des Schüttelns dieser Kulturen bei 30 °C und 160 Umdrehungen pro min ergaben sich die folgenden Änderungen:

Beispiel 6

Dieses Beispiel zeigt die Wirkung der Belüftung auf das Wachstum der Kulturen in Tabakextrakt.

Cellulomonas sp. wurden in Wasserextrakt rauchgasbehandelten Burley-Stengeln hergestellt, gemäss dem Beispiel 1(c), unter den folgenden Prüfbedingungen in einem New Brunswick Scientific Fermentor (MF214) gezogen: Schütteln (Umdrehungen pro min) – 600

Belüftung (cc/min) – 8000
 pH – 7,3
 Temperatur (°C) – 30
 Zeit (Stunden) – 22
 Schaumbrecher – p-1200 (Dow Chemical Company)
 Impfstoffmenge (v/v) – 5%
 Medium (Volumen) – 8 L

Mediumtyp – Wasserextrakt rauchgasbehandelter Burley-Stengel.
 pH wurde angepasst unter Verwendung von 2N HCl und 2N NaOH

Die Zellmasse wuchs und chemische Wechsel während der Kulturzucht waren:

| Zeit | Zellenzählung ($\times 10^6$ /ml) | pH | Nitrat (μ g/ml) | Alkaloide (Nikotin) (mg/ml) |
|--------------------------|---------------------------------------|------|-------------------------|--------------------------------|
| Vor der Impfung | 0 | 7,31 | 1534 | 0,32 |
| Impfung | 5000 | 8,17 | 0 | 0,02 |
| Nach der Impfung | 350 | 7,40 | 1486 | 0,30 |
| 1 Std. nach der Impfung | 490 | 7,40 | 1448 | 0,27 |
| 3 Std. nach der Impfung | 640 | 7,41 | 1491 | 0,20 |
| 5 Std. nach der Impfung | 1220 | 7,35 | 1449 | 0,08 |
| 22 Std. nach der Impfung | 4200 | 7,23 | 1450 | 0,02 |

Diese Daten zeigen, dass unter den angewandten Bedingungen, im besonderen bei hoher Belüftungsgeschwindigkeit (8000 cc/min), Nitrat nicht abgebaut wird, jedoch Alkaloide.

Die auf diese Weise gezogene Kultur wurde zur Behandlung von Burley-Blatt-Tabak wie folgt verwendet:

| Tabak-Trockengewicht (kg) | Kultur (ml) | NaOH (1N) (ml) | Wasser (ml) |
|------------------------------|----------------|-------------------|----------------|
| 1,72 | 2436 | 379,5 | 2269 |

Die Behandlung wurde in einem Kunststoffbeutel (nicht umgebungsbelüftet) bei 30 °C während 24 Std. mit den folgenden Resultaten durchgeführt:

| Behandlungszeit (Stunden) | NO ₃ (%) | Alkaloide (%) | Feuchtigkeit (%) | pH |
|------------------------------|------------------------|------------------|---------------------|------|
| 0 | 3,54 | 1,42 | 74,4 | 7,33 |
| 24 | 0,22 | 0,32 | 76,4 | 8,38 |

Daraus ergibt sich, dass in einer nicht belüfteten Umgebung die Cellulomonas sp. sowohl Nitrat als Nikotin abbaut. Der erniedrigte Nitrat- und Nikotin-Burley-Tabak wurde mit andern Tabaken vermischt und mit einer Kontrollmischung verglichen, welche unbehandelten Burley-Tabak enthielt. Die Resultate sind anschliessend angeführt.

Chemische Eigenschaften der Mischung

| | NO ₃ (%) | Alkaloide (Nikotin) (%) | pH |
|-----------------------|------------------------|-------------------------------|------|
| Testprodukt** | 1,63 | 1,79 | 5,47 |
| Experimentierprodukt* | 1,04 | 1,32 | 6,00 |

** Enthielt unbehandelten Burley-Blatt-Tabak

* Enthielt behandelten Burley-Blatt-Tabak

Diese Mischungen wurden zu Zigaretten verarbeitet und Maschinen rauchten sie mit den folgenden verringerten Mengen an Stickoxiden, Wasserstoffcyanid und Nikotin.

| | Per Zug angefallene Mengen | | | Züge |
|----------------------|----------------------------|-------------------|-----------------|------|
| | NOx (μ g) | HCN (μ g) | Nikotin (mg) | |
| Testprodukt | 54 | 28,4 | 0,13 | 7,3 |
| Experimentierprodukt | 33 | 22,8 | 0,11 | 7,2 |

Die Rauchdaten zeigen 38,8% Verringerung der Stickoxide (NOx); 19,78% Verringerung der Wasserstoffcyanid und eine 15,3%-ige Verringerung des Nikotins.

Beispiel 7

Dieses Beispiel zeigt die Wirkung der Belüftung im Wachstum der Kultur, wobei verringerte Belüftung die Umgebung ermöglicht, in Flüssigkeitssystemen Nitrat abzubauen.

Cellulomonas sp. wurden in einem wässrigen Extrakt von geräucherten Burley-Stengeln gezogen, welcher Extrakt gemäss Beispiel 1 (c) unter den folgenden Bedingungen in einer New Brunswick Scientific Fermentor (MF214) hergestellt wurde:

Rühren (Umdrehungen pro min) – 600 (die ersten 4 Std.)
 – 300 (die letzten 20 Std.)
 Belüftung (cc/min) – 8000 (nur die ersten 4 Std.)
 keine (die letzten 30 Std.)

pH – 7,0
 Temperatur (°C) – 30
 Zeit (Stunden) – 24
 Schaumbrecher – p-1200 (Down Chemical Company)
 Impfstoffmenge (%) (v/v) – 5
 Medium (Vol.) – 8 L
 Medium – Wasserextrakt von geräucherten Burley-Stengeln
 Der pH-Wert wurde durch Verwendung von 2N HCl und 2N NaOH angepasst.

Die Zellmasse stieg an und die chemischen Änderungen während des Wachstums waren:

| Zeit | Zellen-Zählung ($\times 10^6$) | pH | Nitrat ($\mu\text{g/ml}$) | Alkaloide (Nikotin) (mg/ml) |
|--------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------|--|
| Vor der Impfung | * | 7,12 | 3173 | 0,48 |
| Impfung | 7400 | 7,40 | 50 | 0,05 |
| Nach der Impfung | 155 | 7,27 | N.D. | N.D. |
| 1 Std. nach der Impfung | 430 | 7,25 | N.D. | N.D. |
| 2 Std. nach der Impfung | 410 | 7,17 | N.D. | N.D. |
| 3 Std. nach der Impfung | 840 | 7,14 | 2534 | N.D. |
| 4 Std. nach der Impfung | 1040 | 7,02 | 1171 | 0,06 |
| 6 Std. nach der Impfung | 1490 | 7,08 | 50 | N.D. |
| 8 Std. nach der Impfung | 2500 | 7,15 | 50 | 0,06 |
| 24 Std. nach der Impfung | 8000 | 7,34 | 50 | 0,06 |

* = Geringe Verunreinigung
 N.D. = Keine Analyse

Die vorstehenden Werte zeigen, dass unter den herrschenden Bedingungen, insbesondere einer hohen Anfangsbelüftungsgeschwindigkeit (4 Std.) und dann keine merkliche Belüftung mehr (20 Std.), sowohl Nitrat als Alkaloide abgebaut wurden. Es kann, genauer ausgedrückt, beobachtet werden, dass der Nitratabbau, nachdem die Belüftung eingestellt worden war, sehr rasch eintrat.

Die in diesem Beispiel beschriebene gezogene Kultur fand Verwendung, um eine geräucherte Burley-Stengelmischung während 27 Std. durch Impfung mit einer Geschwindigkeit von 2,4 ml/g Tabak und bei einer Inkubationstemperatur des Tabaks von 30 °C zu behandeln. Dabei vollzogen sich die folgenden typischen chemischen Änderungen:

| ²⁰ Behandlungs-Zeit (Std.) | NO ₃ (%) | Alkaloide (%) |
|---------------------------------------|------------------------|------------------|
| 0,0 | 2,8 | 0,34 |
| 6,5 | 2,3 | keine Analyse |
| ²⁵ 27,0 | 0,4 | 0,06 |

Die behandelten Tabake wurden mit anderen Tabaken gemischt und mit einer Testmischung verglichen, welche un-

³⁰ behandelte Stengel aufwies, wie dies anschliessend für zwei unterschiedliche Einschluss-Mengen aufgeführt wird:

Chemische Eigenschaften der Mischung

| Probe | Stengel-Beigabemengen | NO ₃ (%) | Alkaloide (Nikotin) (%) | pH |
|----------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|------|
| Test | Normal | 1,33 | 1,85 | 5,45 |
| | 2,5 \times normal | 1,67 | 1,47 | 5,48 |
| Versuch* | Normal | 0,85 | 1,79 | 5,77 |
| | 2,5 \times normal | 0,69 | 1,26 | 6,42 |

* Enthielt behandeltes Stengelmaterial.

Diese Mischungen wurden zu Zigaretten verarbeitet und maschinell geraucht, wobei sich die folgenden Unterschiede

zwischen der Testmischung und den Versuchsprodukten ergaben:

| Muster | Stengel-Beigabemengen | Per Zug angefallene Mengen | | | |
|---------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|------|
| | | NOx (μg) | HCN (μg) | Nikotin (mg) | Züge |
| Test | Normal | 44,4 | 24,4 | 0,13 | 8,8 |
| | 2,5 \times normal | 51,8 | 18,7 | 0,11 | 8,3 |
| Versuch | Normal | 32,2 | 19,1 | 0,13 | 9,5 |
| | 2,5 \times normal | 20,7 | 7,4 | 0,09 | 10,0 |

Die im Rauch angefallenen Daten waren: 27% und 60% Verringerung von Stickoxiden und 21,7% und 60,4% Verringerung in Wasserstoffzyanid für normale und 2,5 \times normale Zugabemengen von behandeltem Stengelmaterial. Die Daten zeigen auch ein beträchtliches Anwachsen in der Zugzahl, wenn behandelte Tabak in der Mischung in der Höhe des 2,5 fachen Normalwertes beigegeben wurde.

Beispiel 8

Dieses Beispiel zeigt das Vorgehen beim Extrahieren von Blatt-Tabak mit Wasser, um Nitrat und Nikotin zu entfernen. Der Extrakt wurde mit *Cellulomonas* sp. behandelt um Nitrat und Nikotin abzubauen, gefolgt von der Zugabe des geänderten, behandelten Extraktes zum Originaltabak. Es wurde ein Tabakextrakt hergestellt, indem 100 g Burley-

Blatttabak mit einem 1 Wasser gemischt und bei Raumbedingungen während 2 Std. stehengelassen wurde. Dann wurde der Extrakt durch Dekantieren der Flüssigkeit und Auspressen der zusätzlichen Flüssigkeit aus dem Tabak gesammelt. Der Tabak wurde zum Trocknen in einem luftigen Raum ausgelegt, während der Extrakt (700 ml) einer mikrobiologischen Behandlung, wie im folgenden beschrieben, unterzogen wurde.

Cellulomonas sp. Behandlung von Burley-Blatt-Tabakextrakt

| | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloide (Nikotin) (mg/ml) |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Burley-Blattextrakt | 1872 | 1,47 |
| Reife Cellulomonas sp.-Kultur | 0 | 0 |
| Extrakt nach der Behandlung | 66 | 0,09 |

Daraus ergibt sich, dass aufgrund der Behandlung Nitrat und Nikotin annähernd vollständig abgebaut waren (96,5% und 93,9%). Nach 18 Std. wurde der behandelte Extrakt infolge der grossen Menge in 3 Stufen in die ursprünglich extrahierte Tabaklösung zugegeben. Dies wurde in dem Sinne ausgeführt, als ein Teil zugegeben, sorgfältig gemischt und Luft-Trocknung vorgängig der nächsten Zugabe vorgenommen wurde. Die folgenden chemischen Änderungen ergaben sich während dieses Vorgehens:

| Tabak-Analyse | NO ₃ (%) | Alkaloide (Nikotin) (%) |
|---|------------------------|----------------------------|
| Burley-Blatt vor der Extraktion | 1,96 | 2,46 |
| Burley-Blatt nach der Extraktion | 0,72 | 0,97 |
| Burley-Blatt nach der Behandlung durch Zugabe behandeltem Extrakt | 0,39 | 0 |

Daraus ist ersichtlich, dass die Nitrate und Alkaloide (Nikotin) aus dem Extrakt verschwanden. Sie werden also im Tabak, zu welchem behandelter Extrakt zurückversetzt wird, wesentlich verringert. 80% des Nitrates und 100% der Alkaloide wurden durch dieses Verfahren abgebaut. Ein Teil des Nitrats und der Alkaloide wurde aus dem Tabak während des der Zugabe des behandelten Extraktes folgenden Trocknens durch die Kultur abgebaut.

Die Tabake, welche aus diesem Verfahren resultierten, wurden zur Herstellung von Typ-Arbeitsgängen verwendet.

Beispiel 9

Dieses Beispiel zeigt gewisse Unterschiede im Endprodukt, welches durch die Verwendung einer Ultra-Filtrationsausrüstung in Verbindung mit Tabakextraktion resultiert, wobei die Behandlung des Extraktes und das Wiederzugeben des behandelten Extraktes gemäss Beispiel 8 erfolgte. Bei dem in diesem Beispiel verwendeten Tabak handelt es sich um die gleiche Sorte, wie im Beispiel 8.

Ein Burley-Blatttabakextrakt wurde gemäss Beispiel 8 hergestellt. Dann wurde der Extrakt vor der Impfung des gefilterten Extraktes mit Cellulomonas sp. mit einem 0,2 Mikron-Porengrössenfilter in einer Amikon-Ultrafiltrationsvorrichtung (Modell TCF10) gefiltert und nachher behandelt, wie dies im Beispiel 8 beschrieben ist. Anschliessend wurde der Extrakt wiederum gefiltert, bevor er wiederum zu-

Eine reife Kultur von Cellulomonas sp. wurde in einem separaten Tabakextrakt gezogen, wie dies im Beispiel 1 (c) beschrieben ist. Sie wurde mit einer Geschwindigkeit von 10% (v/v) zum vorstehend erläuterten Tabakextrakt gemischt. Bevor die Kultur zugesetzt wurde, wurde der pH-Wert des Extraktes auf $7,0 \pm 0,1$ justiert. Die Kultur wurde im Extrakt in einer Erlenmeyerflasche mit Rührer bei 30 °C inkubiert. Über die 18 Std. Inkubationszeit ergaben sich die folgenden chemischen Änderungen:

gemischt wurde. Das im Filter während der ersten Filtration zurückgehaltene Material wurde ebenfalls in den extrahierten Tabak zurückgegeben.

Das im Filter während der zweiten Filtration abfiltrierte Material wurde dem Tabak nicht zugefügt. Im Extrakt ergaben sich die folgenden chemischen Änderungen:

Chemische Änderungen durch die Ultrafiltration und Cellulomonas sp.-Behandlung von Burley-Extrakt

| | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloide (Nikotin) (mg/ml) |
|--|----------------------------|-----------------------------------|
| Burley-Blattextrakt | 1872 | 1,47 |
| Reife Cellulomonas sp.-Kultur | 0 | 0 |
| Extrakt nach dem Filtrieren | 2028 | 1,48 |
| Extrakt nach Cellulomonas sp.-Behandlung | 110 | 0,12 |

Die folgenden chemischen Änderungen wurden im extrahierten Tabak während der Extraktion und der Behandlung gemessen:

| Tabak-Analyse | NO ₃ (%) | Alkaloide (Nikotin) (%) |
|---|------------------------|----------------------------|
| Burley-Blatt | | |
| Vor Extrahieren | 1,96 | 2,46 |
| Nach Extrahieren | 0,72 | 0,79 |
| Nach der Rückführung des behandelten Extraktes in den Extrakt | 0,75 | 0,72 |

Es ergibt sich daraus, dass Nitrate und Alkaloide (Nikotin) aus dem Extrakt durch Cellulomonas sp. abgebaut wurden, dass aber, im Gegensatz zum Beispiel 8 während den Zugaben des behandelten Extraktes ein weiterer Abbau im extrahierten Tabak erfolgte. In diesem Beispiel kam die mikrobiologische Kultur mit dem Tabak nie in Berührung, wogegen im Beispiel 8 die Kultur während des Rückgiessens mit dem Tabak in Berührung kam.

Die aus diesen Verfahren hervorgegangenen Tabake wurden verwendet, um Typ-Operationen herzustellen.

Beispiel 10

Dieses Beispiel zeigt die Wirkung von *Cellulomonas* sp. beim Abbau von Nitrat und Nikotin aus rekonstituierten Tabakmaterialien.

Es wurde wie folgt eine Wasser-Extraktbrühe hergestellt: 150 g rekonstituierten Tabaks wurde in einem l Wasser in einem Waring-Mischer während einer min gemischt. Diesem Aufweichen folgte das Mischen bei Raumtemperatur während 10 min, nach welchem die Flüssigkeit abzentrifugiert, die fehlende Flüssigkeitsmenge durch Nachfüllen von destilliertem Wasser auf das ursprüngliche Volumen ergänzt und anschliessend bei 121 °C, $1,03 \pm 10^5$ Pa Überdruck während 15 min sterilisiert wurde. Es wurden getrennte Präparate hergestellt, zu welchen Hefeextrakt (YE) in einer Menge von 0,5% (Gew. pro Volumen) vor dem Sterilisieren beigegeben wurde. Geräucherter Burley-Stengelextrakt (mit 0,5% Hefeextrakt) wurde wie im Beispiel 1 (c) hergestellt und als Testextrakt verwendet. Der pH-Wert der Brühe wurde auf 7,2 eingestellt, bevor die Impfung mit *Cellulomonas* sp. erfolgte.

Er ergaben sich die folgenden Resultate:

| Test | | | |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|------|
| Wachstumszeit (Std.) | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloide (Nikotin) (mg/ml) | pH |
| 0 | 2246 | 0,23 | 7,30 |
| 24 | 0 | 0 | 8,50 |
| 48 | 0 | 0 | 8,12 |

| Versuche | | | |
|-------------------|-------------------------|-----------------------------|------|
| Ohne Hefe-Extrakt | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloide (Nikotin) (mg/ml) | pH |
| 0 | 1859,0 | 1,12 | 7,34 |
| 24 | 1641,0 | 0,88 | 7,46 |
| 48 | 39,0 | 0,08 | 8,08 |

| Mit Hefe-Extrakt | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloide (Nikotin) (mg/ml) | pH |
|------------------|-------------------------|-----------------------------|------|
| 0 | 1878,0 | 1,09 | 7,21 |
| 24 | 0,28 | 0,35 | 8,04 |
| 48 | 0,14 | 0,06 | 8,17 |

Es ergibt sich daraus, dass die Kultur tatsächlich Nitrat und Alkaloide (Nikotin) von rekonstituiertem Tabak mit oder ohne Zusatz von Hefeextrakt abbauen kann.

Beispiel 11

Dieses Beispiel zeigt die Wirkungen von aeroben und anaeroben Tabakbehandlungen.

- 15 *Cellulomonas* sp. wurde gemäss Beispiel 1 (c) in geräucherter Burley-Extraktbrühe, jedoch ohne Hefeextrakt, während 25,5 Std. in einer New Brunswick Scientific Fermentor (TMP214) unter den folgenden Bedingungen gezüchtet: Rühren (Umdrehungen pro min) – 600 (erste 4 Std.) – 300 (letzte 21,5 Std.)
- 20 Belüftung (cc/min) – 8000 (erste 4 Std.) – 0 (letzte 21,5 Std.)
Mittel – geräucherte Burley-Extraktbrühe
Mittel – Volumen (L) – 8
- 25 Temperaturen (°C) – 30
pH – 7,0
Impfstoffmenge (% v/v) – 5
Impfzeit (Stunden) – 22
Schaumbrecher – p-1200 (Dow Chemical)
- 30 Impfen, Rührgeschwindigkeit (rpm) – 160
Impfmittel -geräucherte Burley-Extraktbrühe

| Zeit (Std.) | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloide (mg/ml) | pH |
|-------------|-------------------------|-------------------|------|
| 35 Beginn | 3565 | 2,84 | 7,15 |
| 25,5 | 0 | 0,24 | 7,06 |

Nach 25,5 Std. wurde die Kultur zum Behandeln des geräucherten Burley-Stengeltabaks unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit den folgenden Resultaten verwendet:

Aerobe Behandlungen/Zeit (Std.)

| | 0 | | 24 | | |
|-----------|------------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | pH | NO ₃ (%) | Alkaloide (%) | NO ₃ (%) | Alkaloide (%) |
| Behandelt | { 6,48 7,53 5,20 | 2,75 | 0,17 | 0,12 | 0,10 |
| Test | | 2,75 | 0,17 | 0,13 | 0,09 |
| | | 2,75 | 0,17 | 2,72 | 0,12 |

Anaerobe Behandlungen/Zeit (Std.)

| | 0 | | 24 | | |
|-----------|------------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | pH | NO ₃ (%) | Alkaloide (%) | NO ₃ (%) | Alkaloide (%) |
| Behandelt | { 6,82 7,22 5,20 | 2,75 | 0,17 | 0,12 | 0,09 |
| Test | | 2,75 | 0,17 | 0,15 | 0,09 |
| | | 2,75 | 0,17 | 2,78 | 0,19 |

Alle Behandlungen wurden bei 75% Feuchtigkeitsgehalt und bei 30 °C während 24 Std. in Plastikbeuteln vorgenommen. Auch die anaeroben Behandlungen wurden in BBL (Baltimore Biological Laboratories) «GASPAK» Anaerob-

65 System-Standgefässen unter Verwendung von BBL-Katalysatoren zum Binden von atmosphärischem Sauerstoff.

Es ergibt sich aus den vorerwähnten Daten, dass die vorliegende Erfindung unter anaeroben Bedingungen und unter

Bedingungen, bei welchen der Sauerstoffgehalt nicht überwacht wird, durchgeführt werden kann.

Beispiel 12

Dieses Beispiel zeigt die Wirkung der Behandlung von Tabaken, sowohl mit Kulturen, als auch mit sog. Faulwasser aus der Zellenzüchtung.

Cellulomonas sp. wurden mit 0,5% (Gew./Vol.) Hefeextraktbeigabe in Flaschen in geräucherter Burley-Stengelextraktbrühe gemäss Beispiel 1 (c) gezogen.

Die Flaschenimpfung und Inkubation wurden wie im Beispiel 1 (d) vorgenommen. Am Ende der Inkubationsperiode wurde die Kultur, wie dies in Fig. 1 dargestellt ist, verwendet.

Folgendes resultierte aus der in der Figur dargestellten Behandlung.

Tabelle 1/Kulturherstellung

| | | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloide (mg/ml) | pH |
|---|------------|----------------------------|----------------------|------|
| Geräucherte Burley-Extraktbrühe mit 0,5% YE | | | | |
| Prüfung | 0 Stunden | 1618 | 0,290 | 7,13 |
| (ungeimpft) | 24 Stunden | 1550 | 0,290 | 7,04 |
| Geimpft | 0 Stunden | 1559 | 0,280 | 7,11 |
| | 24 Stunden | 39 | 0,028 | 8,06 |
| Wieder zugeführte Zellen | | 0 | 0 | 8,32 |
| Faulbrühe | | 36 | 0,026 | 8,16 |
| Gefilterte Faulbrühe | | 40 | 0,026 | 8,27 |

Wiederzugefügte Zellen und gefilterter Überlauf wurden verwendet, um getrennt frische Flaschen von geräucherter Burley-Extraktbrühe bei 10 ml pro Flasche (250 ml Extrakt/500 ml Flasche) zu impfen und bei 30° während 24 Std. bei

220 Umdrehungen pro min zu inkubieren. Der Extrakt wurde wie im Beispiel 1 (c) hergestellt.

Es wurde folgendes erhalten:

Tabelle 2

| | Zeit (Std.) | NO ₃ (µg/ml) | Alkaloide (mg/ml) | pH |
|-------------------------|----------------|----------------------------|----------------------|------|
| Wiederaufgelöste Zellen | 0 | 1482 | 0,27 | 7,02 |
| | 24 | 0 | 0 | 8,15 |
| Gefilterte Faulbrühe | 0 | 1522 | 0,27 | 7,21 |
| | 24 | 1022 | 0,30 | 7,75 |

Wiederzugegebene Zellen, Original-Kultur, gefilterte und ungefilterte Faulbrühe wurden alle verwendet, um 50 g Muster von geräucherten Burley-Stengeln bei ungefähr 75% Feuchtigkeit während 24 Stunden bei 30 °C in Plastikbeuteln

zu behandeln. Ein Testmuster wurde bezüglich pH-Wert justiert und ohne Impfung wasserbehandelt. Die folgenden Resultate wurden erhalten:

Tabelle 3/Tabakbehandlungen

| | Zeit (Std.) | NO ₃ (%) | Alkaloide (Nikotin) (%) | pH |
|-------------------------|----------------|------------------------|----------------------------|------|
| Test (keine Impfung) | 0 | 4,34 | 0,59 | 6,83 |
| | 24 | 4,12 | 0,37 | 6,99 |
| Original-Kultur | 0 | 4,48 | 0,56 | 7,22 |
| | 24 | 0,61 | 0,05 | 8,54 |
| Wiederzugegebene Kultur | 0 | 4,33 | 0,56 | 7,03 |
| | 24 | 2,72 | 0,18 | 8,06 |
| Faulbrühe | 0 | 4,65 | 0,56 | 7,25 |
| | 24 | 4,51 | 0,42 | 7,24 |
| Filtrierte Faulbrühe | 0 | 4,46 | 0,57 | 7,26 |
| | 24 | 4,04 | 0,49 | 7,12 |

Es ergibt sich daraus, dass die Faulbrühe, wenn sie von der Kultur getrennt wurde, die Fähigkeit, Nitrate und Nikotine im Tabak abzubauen, nicht besitzt.

Es ist ferner möglich, ein Tabakprodukt mittels eines Verfahrens zum Herabsetzen der Nitrat- und Nikotingehalte des Tabaks herzustellen, das folgende Verfahrensschritte aufweist:

- a) Zusammenbringen von Tabak und einer wässrigen Lösung, welche einen Mikroorganismus enthält, der Nitrat und Nikotin dieses Tabaks abbaut und
- b) Halten des Tabaks unter dem Einfluss des Mikroorganismen während ungefähr 18 Std. bei einer Temperatur von 20 bis 40 °C.
- Die wässrige Lösung weist eine nitratenthaltende Verbindung auf.
- Die Nitratverbindung wird aus der Gruppe von Kaliumnitrat, Natriumnitrat und Ammoniumnitrat gewählt.
- Ferner wird die Nitratverbindung in der Menge von 0,1 bis 1,0 Gew.% der wässrigen Lösung beigegeben.
- Die Mikroorganismen sind *Cellulomonas* sp.
- Die Einwirkung erfolgt bei einem pH von ungefähr 7,0 bis 9,5.
- Die wässrige Lösung wird wie folgt hergestellt:
 - a) Zugabe von mindestens 5 Gew.% Nähragar zu Wasser, um eine erste Lösung zu bilden,
 - b) Zugabe von 0,1 bis 1 Gew.% einer Nitrat enthaltenden Komponente zu dieser ersten Lösung,
 - c) Sterilisieren der ersten Lösung, indem man die Lösung bei einem Druck von mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck bei mindestens 121 °C während einer Zeitspanne von mindestens 15 min sterilisiert,
 - d) dass man *Cellulomonas* sp. zur sterilisierten Lösung gibt, um diesen Kulturen das Wachstum während einer Zeitspanne von 3 bis 5 Tagen bei einer Temperatur von 20 bis 40 °C zu ermöglichen, und
 - e) dass man die daraus resultierende Kultur vom Nährboden Agarnitratmedium entfernt.
- Das Sterilisieren des ersten Mediums erfolgt in einem Testrohr, wobei die geeignete Mediumsfläche als Kulturboden dient.
- Das Produkt zeichnet sich durch die Herstellung einer Tabakextraktbrühe gemäss folgenden Schritten:
 - a) Zugabe von Tabakmaterial zu Wasser, um eine zweite Lösung zu bilden,
 - b) Kochen dieser zweiten Lösung in einem Gefäss während mindestens 40 min, bei mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck und einer Temperatur von mindestens 121 °C,
 - c) dass man die zweite Lösung mit Wasser auf ungefähr das ursprüngliche Volumen bringt,
 - d) dass man Hefeextrakt in der Menge von 0,1 bis 2 Gew.% pro Volumen beimischt,
 - e) dass man die zweite Lösung während mindestens 15 min und mindestens $1,03 \cdot 10^5$ Pa Überdruck sowie einer Temperatur von mindestens 121 °C sterilisiert, und
 - f) dass man die erhaltene Kultur von der Nährboden-Agara-Nitrat-Verbindung auf diese sterilisierte zweite Lösung bringt.
- 25 - Dieser Tabak wird in Verbindung mit den Mikroorganismen in Abwesenheit von freiem Sauerstoff gebracht.
- Der Tabak wird in Verbindung mit den Mikroorganismen unter Sauerstoffeinfluss gebracht.

30

35

40

45

50

55

60

65

