



(19)

österreichisches  
patentamt

(10)

AT 413 540 B 2006-03-15

(12)

## Patentschrift

- (21) Anmeldenummer: A 2000/2001 (51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 1/20  
(22) Anmeldetag: 2001-12-20 C12N 1/16  
(42) Beginn der Patentdauer: 2005-08-15  
(45) Ausgabetag: 2006-03-15

(56) Entgegenhaltungen:  AT 406166B WO 96/06175A MADHYASTHA M.S. ET AL., ARCH ENVIRON CONTAM TOXICOL 1992 NOV; 23(4) : 468-72 XIAO, H. ET AL., J ANIM SCI 1991 SEP; 69(9) : 3706-14	(73) Patentinhaber:  ERBER AKTIENGESELLSCHAFT A-3130 HERZOGENBURG, NIEDERÖSTERREICH (AT).
	(72) Erfinder:  SCHATZMAYR GERD DR. WIEN (AT). HEIDLER DIAN DR. WIEN (AT). FUCHS ELISABETH DIPL.ING. WIEN (AT). BINDER EVA-MARIA DR. TULLN, NIEDERÖSTERREICH (AT).

- (54) MIKROORGANISMUS, WELCHER OCHRATOXINE SOWIE OCHRATOXINE UND ZEARALENONE ENTGIFTET, SOWIE VERFAHREN UND VERWENDUNG HIEFÜR
- (57) Mikroorganismus, welcher Ochratoxine sowie Ochratoxine und Zearalenone entgiftet, indem er die Phenylalaningruppe der Ochratoxine abspaltet bzw. Zearalenone abbaut, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismen aerobe oder anaerobe, detoxifizierende Bakterien, gewählt aus: *Sphingomonas* sp. DSM 14170 und DSM 14167, *Stenotrophomonas* nitritreducens DSM 14168, *Stenotrophomonas* sp. DSM 14169, *Ralstonia eutropha* DSM 14171 und *Eubacterium* sp. DSM 14197, oder Hefen, gewählt aus: *Trichosporon* spec. nov. DSM 14153, *Cryptococcus* sp. DSM 14154, *Rhodotorula yarrowii* DSM 14155, *Trichosporon mucoides* DSM 14156 und *Trichosporon dulcitum* DSM 14162, eingesetzt sind, sowie Verfahren zur Entgiftung von Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen in Nahrungs- und Futtermitteln mit einem Mikroorganismus und die Verwendung desselben.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Mikroorganismus, welcher Ochratoxine sowie Ochratoxine und Zearalenone entgiftet, indem er die Phenylalaningruppe der Ochratoxine abspaltet bzw. Zearalenone abbaut, sowie auf ein Verfahren zur biologischen Entgiftung von Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen in Nahrungs- und Futtermitteln sowie auf

- 5 die Verwendung von Bakterien und/oder Hefen zur Detoxifizierung von Ochratoxinen in Nahrungs- oder Futtermitteln.

Mykotoxine sind natürliche, sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die weltweit landwirtschaftliche Produkte befallen und schon in geringen Mengen toxische Wirkungen

- 10 hervorrufen. Aufgrund des Befalls von landwirtschaftlichen Produkten mit Mykotoxinen entstehen extrem hohe Schäden und es werden weiters Mykotoxikosen bei Menschen und Tieren hervorgerufen, welche teilweise dramatische Wirkungen zeigen. Aufgrund der hohen wirtschaftlichen Verluste sowie der Belastung von Menschen und Tieren mit Mykotoxinen und den dadurch hervorgerufenen Mykotoxikosen wurde bereits seit langem nach Möglichkeiten gesucht, 15 Maßnahmen gegen die Kontaminierung mit Mykotoxinen zu ergreifen, wobei aus der Literatur prinzipiell zwei Methoden bekannt sind. Eine erste versucht, das Wachstum der Schimmelpilze auf Lebens- bzw. Futtermitteln zu verhindern, wodurch gleichzeitig die Produktion der Mykotoxine verhindert wird. Eine zweite Methode versucht, nachträglich die Mykotoxine zu zerstören oder Lebens- und/oder Futtermittel zu dekontaminieren.

- 20 So ist beispielsweise in der WO 91/13555 ein Futtermittelzusatz sowie ein Verfahren zur Inaktivierung von Mykotoxinen beschrieben, wobei dem Futter Teilchen eines Phyllosilikatminerals zugesetzt werden, um die Mykotoxine zu inaktivieren. Zur Verstärkung der Wirkung dieser Phyllosilikate sind die Teilchen mit einem Sequestrierungsmittel beschichtet, um die Wirkung zu beschleunigen. Weiters ist beispielsweise aus der WO 92/05706 ein Futtermittel bekannt geworden, in welchem Montmorillonit-Ton als Futtermittelzusatz enthalten ist. Diese natürlichen Tonminerale mit großer innerer Oberflächen sollen aufgrund ihrer Porosität die Mykotoxine oberflächlich binden und auf diese Weise immobilisieren.

- 30 Weiters ist aus dem österreichischen Gebrauchsmuster AT-U 504 ein Futtermittelzusatz bekannt geworden, in welchem eine Enzymzubereitung verwendet wird, welche fähig ist, Epoxidasen und Laktonasen zu bilden und Mykotoxine chemisch sowohl im Futtermittel als auch im Magen-Darm-Trakt von Tieren abzubauen. Gemäß der AT-U 504 kann die Wirkung dieser Enzymzubereitung durch den Zusatz von Zeolithen und dgl. verstärkt werden.

- 35 Die Zugabe von Mykotoxinbindern zu Futtermitteln, die im Zuge der Verdauung unmittelbar im Verdauungstrakt eine Bindung mit den Mykotoxinen eingehen, können die Effekte der Toxine bei der Nutztierhaltung minimieren. Neben den oben erwähnten Möglichkeiten zählen Alfalfa, Bentonite, Zeolith, Tone, Aktivkohle, hydrierte Natriumcalciumaluminumsilikate, Phyllosilikate und Hefe- oder Bakterienzellwände (US 5,165,946; WO 99/57994; US 6,045,834; EP 0721741; US 5,165,946; US 5,935,623; WO 98/34503; WO 00/41806) zu den eingesetzten Substanzen. 40 Die Bindung der Toxine an diese Materialien ist abhängig von den Struktureigenschaften der Toxine. So ist bis heute noch kein effektiver Mykotoxinbinder für die Trichothecene gefunden worden. Ein weiterer Nachteil der Mykotoxinbinder ist, daß sie neben den Toxinen auch wichtige Nährstoffe, wie Vitamine oder Antibiotika, aus den Futtermitteln adsorbieren können.

- 45 In der WO 96/06175 sind Verfahren zum Identifizieren von Organismen beschrieben, die fähig sind, Fumonisins abzubauen.

- 50 In der Literaturstelle Madhyasta, M.S., Marquard, R.R., Frohlich, A.A. (1992), Hydrolysis of ochratoxin A by microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract of rats, Arch. Environ. Toxicol., 23(4) : 468-472, ist beschrieben, daß Darminhalte von Ratten Ochratoxin A hydrolysieren und damit entgiften können, wobei ein Nachweis bzw. Wirkmechanismus nicht aufgezeigt ist.

Schließlich ist in der Literaturstelle Xiao, H., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Phillips, G.D. und Vitti, T.G., Effect of a hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep, J. Animal Science, Vol. 69 (1991), S. 3706 - 3714, der Einfluß verschiedener Substrate auf die Ochratoxin-A-Detoxifikation von Panseninhalten beschrieben.

5 Kürzlich wurde festgestellt, daß Mykotoxine durch Mikroorganismen abgebaut und somit teilweise detoxifiziert werden können. Ein Beispiel für die Detoxifizierung von Mykotoxinen, insbesondere Trichothecenen, ist in der AT-B 406 166 enthalten, bei welchem eine spezielle Reinkultur eines zum Genus Eubacterium gehörenden Mikroorganismus, welcher unter der Nummer 10 DSM 11798 hinterlegt wurde sowie einer Mischkultur des Genus Eubacterium mit einem Enterococcus, welcher unter der Nummer 11799 hinterlegt wurde, die Trichothecene durch Spaltung des an Trichothecenen vorhandenen Epoxyringes detoxifizieren.

Die Detoxifizierung von Ochratoxinen durch enzymatische Hydrolyse wurde bereits von M. J. 15 Pitout: The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes, Biochem. Pharmacol. 18, 485-491 (1969), beschrieben.

Die vorliegende Erfindung zielt nun darauf ab, spezielle Mikroorganismen sowie Misch- oder 20 Reinkulturen und auch Kombinationen derselben zur Verfügung zu stellen, mit welchen es gelingt, Mykotoxine, insbesondere Ochratoxine, gezielt biochemisch abzubauen und in physiologisch unbedenkliche und insbesondere in der Futtermittel- und Nahrungsmittelindustrie unbedenkliche Substanzen umzuwandeln.

Zur Lösung dieser Aufgaben ist der erfindungsgemäße Mikroorganismus der eingangs genannten Art im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismen aerobe oder anaerobe, detoxifizierende Bakterien, gewählt aus: Sphingomonas sp. DSM 14170 und DSM 14167, Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168, Stenotrophomonas sp. DSM 14169, Ralstonia eutropha DSM 14171 und Eubacterium sp. DSM 14197, oder Hefen, gewählt aus: Trichosporon spec. nov. DSM 14153, Cryptococcus sp. DSM 14154, Rhodotorula yarrowii DSM 14155, Trichosporon mucoides DSM 14156 und Trichosporon dulcitum DSM 14162, eingesetzt sind. Dadurch, daß als Mikroorganismen aerobe oder anaerobe, detoxifizierende Bakterien, gewählt aus: Sphingomonas sp. DSM 14170 und DSM 14167, Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168, Stenotrophomonas sp. DSM 14169, Ralstonia eutropha DSM 14171 und Eubacterium sp. DSM 14197, oder Hefen, gewählt aus: Trichosporon spec. nov. DSM 14153, Cryptococcus sp. DSM 14154, Rhodotorula yarrowii DSM 14155, Trichosporon mucoides DSM 14156 und Trichosporon dulcitum DSM 14162, eingesetzt sind, gelingt es, die Phenylalaningeruppe der Mykotoxine, insbesondere Ochratoxine, abzuspalten, wodurch Ochratoxine, insbesondere Ochratoxin A oder Ochratoxin B, in jene Metaboliten umgewandelt werden, die keine Phenylalaningeruppe aufweisen, und daher den toxischen Effekt der Ochratoxine nicht mehr zeigen. 40 Diese Metabolisierung der Ochratoxine geschieht durch ein der Carboxypeptidase A ähnliches Enzym, welches direkt die Amidbindung des Ochratoxins spaltet, oder auch durch, einen Multi-enzymkomplex, durch den der Ring des Phenylalanins hydroxyliert wird und in weiterer Folge gespalten und abgebaut wird. Schließlich wird das verbliebene Aspartam abgespalten, wodurch wieder ein ungiftiger Metabolit der Ochratoxine erhalten wird. Dieser Weg kann in einfacher 45 Weise wie folgt dargestellt werden:

Mit den erfindungsgemäßen Mikroorganismen gelingt neben der Detoxifizierung von Ochratoxin A und Ochratoxin B auch jene der Metaboliten 4R-Hydroxyochratoxin A, 4S-Hydroxyochratoxin A, Ochratoxin C, Ochratoxin A Methylester, Ochratoxin B Methylester und Ochratoxin B Ethylester. 50

Die Tatsache, daß gemäß der vorliegenden Erfindung als Mikroorganismen sowohl aerobe als auch anaerobe, detoxifizierende Bakterien oder Hefen eingesetzt werden können, ist insbesondere von Bedeutung, da bei Aufnahme von mit entsprechenden Mikroorganismen kontaminierten Nahrungs- und/oder Futtermitteln auch eine Detoxifizierung nach der Aufnahme des Nah-

rungs- und/oder Futtermittels erreicht werden kann. Diese Detoxifizierung ist hiebei in jeder Stufe bzw. in jedem Abschnitt der Passage des Nahrungs- bzw. Futtermittels im Magen-Darm-Trakt möglich, da jedesmal gezielt die entsprechenden Mikroorganismen oder deren Kombinationen zum Einsatz gebracht werden können. Bekanntermaßen sind die Bedingungen im Magen-Darm-Trakt vom Magen bis zum Dickdarm ansteigend anaerob, was bedeutet, daß das Redoxpotential immer mehr abnimmt, so daß nach Aufnahme von mit entsprechenden Mykotoxinen bzw. Ochratoxinen kontaminierten Nahrungs- und/oder Futtermitteln die Detoxifizierung zuerst mit aeroben Bakterien und/oder Hefen begonnen werden kann und am Ende eines Verdauungsdurchgangs bzw., sofern sich das Nahrungs- bzw. Futtermittel bereits in einem Darmabschnitt befindet, in welchem anaerobe Bedingungen vorherrschen, die Detoxifizierung mit entsprechenden anaeroben Bakterien und/oder Hefen durchgeführt werden kann.

Eine besonders vollständige Detoxifizierung von Mykotoxinen, insbesondere Ochratoxinen, gelingt, wenn als Mikroorganismus, gewählt aus *Sphingomonas* sp. DSM 14170 und DSM 14167, *Stenotrophomonas nitritreducens* DSM 14168, *Stenotrophomonas* sp. DSM 14169, *Ralstonia eutropha* DSM 14171 und *Eubacterium* sp. DSM 14197, sowie die detoxifizierenden Hefen, gewählt aus *Trichosporon spec. nov.* DSM 14153, *Cryptococcus* sp. DSM 14154, *Rhodotorula yarrowii* DSM 14155, *Trichosporon mucoides* DSM 14156 und *Trichosporon dulcitum* DSM 14162, eingesetzt werden, da diese nicht nur einen vollständigen Abbau der Mykotoxine ermöglichen, sondern darüber hinaus auch unbedenklich in Nahrungs- und Futtermitteln zum Einsatz gelangen können, was bei einer Vielzahl von anderen Mykotoxine-spaltenden bzw. -abbauenden Bakterien und Hefen nicht unbedingt der Fall ist.

Unter diesen weiteren, ebenfalls zum Abbau von Mikroorganismen befähigten Bakterien oder Hefen sind die im Folgenden genannten erfolgreich einsetzbar, wobei diese entweder in einem Medium oder Puffer zum Einsatz gelangen können oder auch in beiden Substanzen Wirkung zeigen.

	Stamm	Herkunft	Abbau in	
			Medium	Puffer
30	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Boden	60 %	100 %
	<i>Ochrobactrum</i>	Boden/Wasser	100 %	100 %
35	<i>Achromobacter</i>	Boden/Wasser	50 %	100 %
	<i>Ralstonia</i>	Boden/Wasser	100 %	100 %
	<i>Stenotrophomonas</i>	Boden/Wasser	100 %	100 %
40	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	DSM 1069	75 %	90 %
	<i>Agrobacterium</i> sp.	DSM 30201	20 - 100 %	60 - 100 %
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	DSM 9674	25 - 40 %	0 - 60 %
45	<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 700007	10 - 50 %	0 %
	<i>Comomonas acidovorans</i>	ATCC 11299a	20 - 57 %	0 - 50 %
	Ascomyceten-Hefe	HA 168	95 %	40 %
	<i>Cryptococcus flavus</i>	HB 402	90 %	100 %
50	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HB 403	20 %	0 %
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	HB 404	50 %	0 %
	unbekannt	HB 508	30 %	30 %
	<i>Trichosporon spec. nov.</i>	HB 704	40 %	40 %
55	unbekannt	HB 529	100 %	95 %

	Stamm	Herkunft	Abbau in	
			Medium	Puffer
5	Asocomyceten-Hefe	HA 1265	90 %	0 %
	Asocomyceten-Hefe	HA 1322	0 %	95 %
	Trichosporon ovoides	HB 519	100 %	90 %
10	Triosporon dulcitum	HB 523	100 %	100 %
	Rhodotorula fujisanensis	HB 711	30 %	0 %
	Cryptococcus curvatus	HB 782	20 %	95 %
15	Trichosporon guehoae	HB 892	50 %	20 %
	Trichosp. coremiiforme	HB 896	40 %	20 %
	Trichosporon mucoides	HB 900	100 %	100 %
20	Trichosporon cutaneum	ATCC 46446	0 %	70 %
	Trichosporon dulcitum	ATCC 90777	0 %	100 %
	Trichosporon laibachii	ATCC 90778	0 %	100 %
25	Trichosporon moniliiforme	ATCC 90779	0 %	60 %
	Cryptococcus humiculus	ATCC 90770	0 %	30 %
	Eubacterium sp.	F6	30 - 70 %	100 %
30	Eubacterium callanderi	Di1_8	90 %	100 %
	Streptococcus sp.	Dü2_20		40 - 70 %
	Lactobacillus vitulinus	Ru8		0 - 100 %
35	Stenotrophomonas nitritreducens	DSM 17575	100 %	100 %
	Stenotrophomonas nitritreducens	DSM 17576	50 %	100 %
	Stenotrophomonas sp.	DSM 13117	50 %	95 %

Als besonders vorteilhaft hat sich erwiesen, wie dies auch einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung entspricht, daß Bakterien und/oder Hefen insbesondere durch Lyophilisieren, Sprüh-trocknen oder Mikroverkapseln stabilisiert sind. Durch die Stabilisierung der Mikroorganismen wird ihre Lebensfähigkeit und Lebensdauer verbessert bzw. erhöht, und überdies sind sie im stabilisierten Zustand universeller einsetzbar und somit in jeder beliebigen Anwendung zu jeder Zeit einsetzbar. Das Stabilisieren durch Lyophilisieren, Sprüh-trocknen oder Mikroverkapseln ist an sich bekannt, wobei dies einfache und rasch durchführbare Verfahren sind, welche stabile, lebensfähige Mikroorganismen ergeben.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Substanzen bzw. Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen, welche zur Detoxifizierung von Nahrungs- oder Genußmitteln eingesetzt werden können, ohne daß sie für die aufnehmenden Lebewesen eine Schädigung bzw. Beeinträchtigung mit sich bringen und ohne daß die mit ihnen behandelten Nahrungs- bzw. Genußmittel neben einer Detoxifizierung der Mykotoxine, die auf den Nahrungs- bzw. Genußmitteln vorhanden waren, irgendwelchen Beeinträchtigungen bzw. Veränderungen unterliegen.

Zur Lösung dieser Aufgaben wurde erfindungsgemäß gefunden, daß die Verwendung von Bakterien, gewählt aus Sphingomonas sp. DSM 14170 und DSM 14167, Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168, Stenotrophomonas sp. DSM 14169, Ralstonia eutropha DSM 14171 und Eubacterium sp. DSM 14197, und/oder Hefen, gewählt aus Trichosporon spec. nov.

DSM 14153, Cryptococcus sp. DSM 14154, Rhodotorula yarrowii DSM 14155, Trichosporon mucoides DSM 14156 und Trichosporon dulcium DSM 14162, zur Detoxifizierung von Ochratoxinen in Nahrungsmitteln und/oder Futtermitteln durch Abspaltung der Phenylalaniningruppe des Ochratoxins es ermöglicht, die auf der Oberfläche von Nahrungs- oder Futtermitteln vorhandenen Mykotoxine, insbesondere Ochratoxine, durch Abspalten der Phenylalaniningruppe zu detoxifizieren, ohne die mit ihnen behandelten Nahrungs- bzw. Futtermittel in irgendeiner Weise zu beeinträchtigen bzw. zu beeinflussen.

Als insbesondere geeignet für diesen Zweck hat sich die Verwendung von Trichosporon spec. nov. DSM 14153, Eubacterium sp. DSM 14197 oder Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168 erwiesen, mit welchen ein insbesondere vollständiger Abbau von Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen in Nahrungsmitteln und/oder Futtermitteln erwiesen, gegen welche Mikroorganismen keinerlei Bedenken bestehen.

Um eine insbesondere wirtschaftliche Detoxifizierung von Mykotoxinen, insbesondere in Nahrungs- oder Futtermitteln, zu erreichen, werden Mischkulturen der Bakterien und/oder Hefen zur Detoxifizierung von Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen in Nahrungsmitteln und/oder Futtermitteln verwendet.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur biologischen Inaktivierung bzw. Entgiftung von Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen in Nahrungs- und Futtermitteln mit einem Mikroorganismus zur Verfügung zu stellen, mit welchem es gelingt, die kontaminierenden Toxine vollständig und rasch direkt nach Kontaktierung mit Nahrungs- oder Futtermittel oder im Verdauungstrakt der diese Nahrungs- oder Futtermittel aufnehmenden Lebewesen zu dekontaminieren.

Zur Lösung dieser Aufgabe ist das erfindungsgemäße Verfahren im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß ein erfindungsgemäßer Mikroorganismus mit dem Nahrungs- oder Futtermittel in einer Menge von 0,01 Gew.-% bis 1 Gew.-%, insbesondere 0,05 Gew.-% bis 0,5 Gew.-%, vermischt wird. Indem das Nahrungs- oder Futtermittel mit dem erfindungsgemäßen Mikroorganismus, insbesondere den erfindungsgemäßen Bakterien oder Hefen, in fester Form vermischt wird, kann eine stabile Form von Nahrungs- bzw. Futtermitteln, die mit dem entsprechend stabilisierten Mikroorganismus versetzt sind, erzielt werden. Wenn ein derartiges mit dem erfindungsgemäßen Mikroorganismus versetztes Nahrungs- oder Futtermittel aufgenommen wird, kommt es im Zuge der Einspeichelung zur Ausbildung einer Suspension und die Entgiftung des Nahrungs- bzw. Futtermittels, insbesondere der Abbau der Ochratoxine, beginnt unmittelbar nach Aufnahme des Nahrungs- bzw. Futtermittels durch den Menschen bzw. das Tier. Auf diese Weise gelingt ein vollständiger Abbau von schädlichen Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen im Magen-Darm-Trakt des aufnehmenden Wirtstiers, so daß der Organismus durch schädliche Mykotoxine in keiner Weise belastet wird.

Wenn angestrebt wird, daß bereits entgiftete Nahrungs- bzw. Futtermittel aufgenommen werden, wird gemäß einer Weiterbildung der Erfindung das Vermischen der Nahrungs- bzw. Futtermittel durch Rühren in einer wässrigen Suspension des Mikroorganismus, enthaltend 20 bis 99 Gew.-%, insbesondere 35 Gew.-% bis 85 Gew.-% Wasser bei Temperaturen von 10 bis 60 °C, insbesondere 15 bis 45 °C, für 2 min bis 12 h, insbesondere 5 min bis 2 h, durchgeführt. Dadurch, daß die Nahrungs- oder Futtermittel durch Rühren in einer wässrigen Suspension des Mikroorganismus behandelt werden, gelingt einerseits ein inniger Kontakt der zu behandelnden Nahrungs- oder Futtermittel mit den detoxifizierenden Mikroorganismen und andererseits eine schonende Behandlung der Mikroorganismen, wodurch sichergestellt wird, daß diese durch die Vermischung mit dem Nahrungs- oder Futtermittel nicht verschlechtert bzw. abgetötet werden. Bei diesem Vermischen ist es insbesondere wichtig, zu beachten, daß sowohl die Temperaturen des Vermischens nicht zu hoch bzw. zu tief werden, als auch daß - die Dauer und Zusammensetzung der Aufschlämmung bzw. Suspension vollständig in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung eingehalten werden, um eine Zerstörung bzw. Abtötung der Mikroorga-

nismen mit Sicherheit hintanzustellen.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ist das Verfahren so geführt, daß die Bakterien oder Hefen als zellfreier Extrakt oder Rohextrakt eingesetzt werden. Hierbei wird gemäß einer Weiterbildung bei Einsatz eines zellfreien Extrakts dieser in einer Lösung, insbesondere einer wässrigen Lösung, eingesetzt. Wässrige Lösungen eines zellfreien Extrakts haben den Vorteil, daß sie durch Aufsprühen auf die zu behandelnden Nahrungs- bzw. Futtermittel direkt auf der Oberfläche mit den kontaminierenden Mykotoxinen in Kontakt gelangen und eine Detoxifizierung bereits unmittelbar nach dem Aufsprühen des Extrakts erzielt werden kann. Die Verwendung eines Rohextrakts aus Bakterien und Hefen, der mittels Ultraschall, einem enzymatischen Aufschluß, durch eine Kombination aus Schockfrieren und Auftauen, Durchflußhomogenisator, French-Press, Autolyse bei hoher NaCl-Konzentration und/oder Kugelmühle erhalten ist, weist den Vorteil auf, daß ein derartiger Rohextrakt besonders schnell und unproblematisch erhalten werden kann, so daß insbesondere in Fällen, wo ein rascher Einsatz von detoxifizierenden bzw. Mykotoxine-abbauenden Substanzen erforderlich ist, die Verwendung eines Rohextrakts rasche und zuverlässige Ergebnisse bietet. Darüber hinaus können Rohextrakte unmittelbar in der Futtermittelherstellung eingesetzt werden, so daß die mit Mikroorganismen versetzten Futtermittel von den Tieren aufgenommen werden und die Mikroorganismen, insbesondere Hefen oder Bakterien, erst im Verdauungstrakt des Tiers ihre Wirkung entfalten. In diesem Zusammenhang kann erfindungsgemäß auch ein Gemisch, enthaltend Rohextrakt verschiedener detoxifizierender Bakterien und/ oder Hefen, zum Einsatz gelangen.

Der Einsatz der Mikroorganismen in ungepufferter oder gepufferter Lösung, enthaltend Phosphat- oder Trishydrochloridpuffer mit pH-Werten zwischen 1 und 12, insbesondere zwischen 2 und 8, wie dies einer bevorzugten Ausführung entspricht, bietet den Vorteil, daß die Mikroorganismen unmittelbar mit Nahrungs- bzw. Futtermitteln verabreicht werden können und sie ihre Wirkung im Magen-Darm-Trakt an den Bereichen, wo das Redoxpotential für eine optimale Wirkung der eingesetzten Mikroorganismen geeignet ist, entfalten. Durch Einsatz einer gepufferten Lösung in dem erfindungsgemäßen Verfahren gelingt eine unmittelbare Anpassung an die jeweiligen pH-Werte im Magen-Darm-Trakt, so daß durch die mit der gepufferten Lösung an Mikroorganismen versetzten Nahrungs- bzw. Genußmittel keine Verschiebung bzw. Störung des im Magen-Darm-Trakts vorherrschenden pH-Werts bewirken, was einerseits die leichte Verdaulichkeit der versetzten Nahrungs- bzw. Futtermittel erhöht und andererseits zu keiner Störung der Verdauung in dem Magen-Darm-Milieu führt.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen betreffend die Isolierung der Mikroorganismen und ihrer Wirkungsweise näher erläutert.

1. Anzucht, Produktion und Gewinnung der Hefe *Trichosporum spec. nov. (DSM 14153)*

Für die Aufzucht der Hefe wird die folgende Kulturlösung verwendet:

10 g Hefeextrakt  
20 g Malzextrakt  
45 10 g Glucose  
5 g Pepton  
400 ppm Ochratoxin A  
1 l RO-Wasser  
pH-Wert 5,5

50 Diese wird für 25 min bei 121 °C im Autoklaven behandelt. In einem 100 ml Erlenmeyerkolben werden 30 ml einer Vorkultur angelegt (Inokulumsrate 0,33 %). Die Inkubation erfolgt für 72 h bei 25 °C am Schüttler. Die erreichte Keimzahl beträgt ca. 5 x 10<sup>7</sup>/ml.

55 Danach dienen diese 30 ml der Vorkultur als Inokulum für eine Fermentation in einem 75 l

Fermenter. Für diese Fermentation wird das folgende Kultivierungsmedium eingesetzt:

Malzextrakt	4 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
Pepton	5 g/l
Glucose	10 g/l
Antischaummittel	0,1 %
pH-Wert	5,5

- Als weitere Parameter werden ein  $pO_2$  von 40 % und eine maximale Belüftungsrate von 3  $m^3/h$  eingestellt. Der pH-Wert zu Beginn beträgt 5,00, ändert sich jedoch im Laufe des Wachstumsprozesses (er steigt an bis auf 8,5). Nach ca. 40 - 44 h kann der Inhalt als Inokulum für den 3,6  $m^3$  Produktionsfermenter herangezogen werden. Für diesen wird das folgende Medium verwendet:

Malzextrakt	17 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Pepton	2 g/l
Antischaummittel	0,1 %

- Die Belüftungsrate beträgt 15  $m^3$  Luft pro Stunde. Nach 40 - 48 h können die Zellen mittels Durchflußseparator aufkonzentriert werden. Mittels Separator kann die Fermentationsbrühe ca. 1:10 aufkonzentriert werden, wobei eine Keimzahl von ca.  $3 \times 10^9/ml$  erhalten wird.

- Die anschließende Stabilisierung geschieht mittels Gefriertrocknung oder durch Sprühtrocknung. Als Kryoprotector für die Gefriertrocknung dient Molkepulver.

- Es werden 10 % bezogen auf das Konzentratvolumen zugesetzt. Anschließend wird das Konzentrat bei -80 °C gefroren. Die Gefriertrocknung geschieht bei einem Druck von 0,400 mbar, bei einer Stellflächentemperatur von 20 °C. Die Dauer beträgt bei einer Schichtdicke von 1,5 cm ca. 30 h.

Die Parameter für die Sprühtrocknung:

- Eintrittstemperatur des Trocknungsmediums (Luft): 160 °C
- Austrittstemperatur: 80 °C
- Druck: 3 bar

## 2. Anzucht, Produktion und Gewinnung des Bakteriums *Stenotrophomonas nitritreducens* (DSM 14168)

- Die Anzucht des Bakteriums geschieht in Nährbouillon, einmal in Oxoid CM 001 B und das zweite Mal in CM 067 B mit 400 ppb Ochratoxin A. 30 ml des Mediums werden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben 25 min lang bei 121 °C autoklaviert. Als Inokulum dient 1,5 ml eines Röhrchens aus der "Working Cell Bank". Die Inkubation erfolgt für 72 h bei 30 °C am Schüttler.

Danach dienen diese 30 ml der Vorkultur als Inokulum für eine Fermentation in einem 75 l Fermenter. Für diese Fermentation wird das folgende Kultivierungsmedium eingesetzt:

Pepton aus Fleisch	5 g/l
Fleischextrakt	3 g/l
Antischaummittel	0,1 %

- Als weitere Parameter werden ein  $pO_2$  von 40 % und eine maximale Begasungsrate von 3  $m^3/h$  eingestellt. Die Rührergeschwindigkeit beträgt 200 U/min. Der pH-Wert zu Beginn beträgt ca.

6,8 bis 6,9, ändert sich jedoch im Laufe des Wachstumsprozesses, er steigt an bis auf 8,3. Nach ca. 40 - 44 h kann der Inhalt als Inokulum für den 3,6 m<sup>3</sup> Produktionsfermenter herangezogen werden. Für diesen wurde das folgende Medium verwendet:

5	Sojabohnenmehl	17 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	Pepton	2 g/l
	Antischaummittel	0,1 %

- 10 Die Belüftungsrate ist auf 15 m<sup>3</sup> Luft pro Stunde eingestellt. Die Rührergeschwindigkeit beträgt 250 U/min.

Nach 40 - 48 h können die Zellen mittels Durchflußseparator aufkonzentriert werden. Das Aufkonzentrierungsverhältnis beträgt ungefähr 1:100.

- 15 Die anschließende Stabilisierung geschieht mittels Gefriertrocknung oder durch Sprühtrocknung. Als Kryoprotektor für die Gefriertrocknung dient Molkenpulver.

- 20 Zumeist werden 10 % bezogen auf das Konzentratvolumen zugesetzt. Anschließend wird das Konzentrat bei -80 °C (10 h) oder mit flüssigem Stickstoff (2 h) gefroren. Die Gefriertrocknung erfolgt bei einem Druck von 0,400 mbar, bei einer Stellflächentemperatur von 20 °C. Die Dauer beträgt bei einer Schichtdicke von 1,5 cm ca. 30 h.

Die Parameter für die Sprühtrocknung:

- 25 - Eintrittstemperatur des Trocknungsmediums (Luft): 160 °C  
 - Austrittstemperatur: 80 °C  
 - Druck: 3 bar

### 30 3. Anzucht, Produktion und Gewinnung des Bakteriums *Eubacterium* sp. (DSM 14197)

Zur Anzucht dieses anaeroben Bakteriums wird das folgende Medium herangezogen:

35	D(+)-Glucose	4 g/l
	Pepton aus Casein	2 g/l
	Hefeextrakt	2 g/l
	Minerallösung I [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6 g/l]	75 ml/l
	Minerallösung II [K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6 g/l; (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> 6 g/l; NaCl 12 g/l; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 2,5 g/l; CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 3g/l]	75 ml/l
40	Hämin	1 mg/l
	Fettsäurenmischung	3,1 ml/l
45	Cystein-HCl	0,5 g/l
	Resazurin	1 mg/l
	Ochratoxin A	400 ppb
	pH	6,9

- 50 Die Anzucht erfolgt in einem 100 ml Pyrexfläschchen mit Silikonseptum. 80 ml des autoklavierten Mediums werden abgefüllt und mit einem KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7) versetzt. Nach dem Zusatz des Inhaltes eines Cryovials der Working Cell Bank wird der Kopfraum des Gefäßes mit N<sub>2</sub> begast (1 min). Nach dem Verschließen des Fläschchens wird dieses 72 h lang bei 37 °C inkubiert.

Danach werden 4,5 l der obengenannten Kulturlösung in einer 5 l Schottflasche autoklaviert. Diese besitzt einen Entnahmestutzen und 2 Stutzen mit Sterilfilter (zum Begasen des Inokulums). Nach dem Abkühlen des Mediums auf 37 °C werden zuerst die Pufferlösung (1 % des Phosphatpuffers) und anschließend die 80 ml Inokulum hinzugefügt. Nach der Begasung des Kopfraumes mit Stickstoff (5 min lang) werden die Öffnungen mit Schlauchklemmen verschlossen und das Inokulum bei 37 °C ca. 64 h lang bebrütet. Nach der Reinheitskontrolle kann dieses als Inokulum für einen 1 m<sup>3</sup> Fermenter (Füllvolumen 700 l) verwendet werden.

Zur Produktion wird das folgende Medium eingesetzt:

10	Glucose	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	Pepton	2 g/l
	Cystein-HCl	0,5 g/l
15	pH-Wert	7,00

Nach der Sterilisation des Mediums im Fermentationstank (40 min, 121 °C, 1,21 bar) und der Rückkühlung auf 37 °C wird das Inokulum hinzugefügt. Der Kopfraum des Fermenters wird mit N<sub>2</sub> gespült. Die Rührergeschwindigkeit beträgt 100 U/min, zur pH-Wert-Regulierung wird Natronlauge (8 Mol/l) verwendet. Das Redoxpotential liegt zu Beginn bei ca. -240 mV und nimmt im Laufe des Wachstums auf über - 500 mV ab. Die Fermentationszeit beträgt ca. 48 h. Die Aufkonzentrierung geschieht mittels Durchflußseparator.

Die anschließende Stabilisierung geschieht mittels Gefriertrocknung, Mikroverkapselung oder durch Sprühtrocknung. Als Kryoprotektor für die Gefriertrocknung dient Molkepulver.

Es werden 10 % bezogen auf das Konzentratvolumen zugesetzt. Anschließend wird das Konzentrat bei -80 °C (10 h) oder mit flüssigem Stickstoff (2 h) gefroren. Die Gefriertrocknung geschieht bei einem Druck von 0,400 mbar, bei einer Stellflächentemperatur von 20 °C. Die Dauer beträgt bei einer Schichtdicke von 1,5 cm ca. 30 h.

Der Schutz des Mikroorganismus während der Lagerung bzw. vor ungünstigen Lebensbedingungen geschieht durch Wirbelschichtgranulation mit einem pflanzlichen Fett (Holtmelt Verfahren, Top Spray).

35	Sprührate:	ca. 80 - 150 g/min
	Zulufttemperatur:	50 °C
	Sprühdruck:	3 bar
	Luftmenge:	750 - 1500 m <sup>3</sup> /h
40	Produkttemperatur:	< 47 °C

Die Parameter für die Sprühtrocknung:

- Eintrittstemperatur des Trocknungsmediums (Inertgas): 160 °C
- Austrittstemperatur: 80 °C
- Druck: 3 bar

#### 4. Entgiftung von Ochratoxin A (OTA) durch Bakterien- und Hefeprodukte gemäß den Beispielen 1 bis 3

Von den in Beispiel 1 bis 3 erhaltenen Produkten wird eine logarithmische Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10<sup>-4</sup> in physiologischer Kochsalzlösung angefertigt. Von den Stufen 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-4</sup> werden je 2 ml in 18 ml des entsprechenden Mediums (Minimalmedium (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,44 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,52 g/l; (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,50 g/l; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,20 g/l, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0,05 g/l), Hefemedium oder Nährbouillon (Oxoid CM001B)), welche mit 200 ppb OTA versetzt sind, pipettiert. Die

verwendeten Kolben werden unter den entsprechenden Bedingungen am Horizontalschüttler inkubiert. Nach 2,5, 5 und 24 h werden Proben entnommen und mittels Hochleistungschromatographie auf OTA-Spaltung untersucht. In der Verdünnungsstufe  $10^{-3}$  (entspricht Produktkeimzahlen von  $10^5$ ) haben die Hefen im Minimalmedium nach 5 h 90 % und 24 h 100 % des Ochratoxin A gespalten.

Wird als Testmatrix das komplexe Hefemedium herangezogen, so zeigen die Produkte nach 6 h in der Verdünnungsstufe  $10^{-2}$  eine Spaltungsrate von 90 %. Nach 24 h ist das gesamte OTA entgiftet.

Die Bakterienprodukte haben im Minimalmedium in der Verdünnungsstufe  $10^{-3}$  (Keimzahl von  $10^6$  -  $10^9$ ) nach 2,5 h 40 bis 100 % und nach 24 h 100 % des Ochratoxin A entgiftet. In Nährbouillon verläuft die Entgiftung etwas langsamer - nach 2,5 h sind in der Stufe 3 40 bis 50 % und 24 h 80 bis 100 % detoxifiziert. Diese Versuche zeigten, daß die Mikroorganismen in stabile Produkten überführt werden können, die sowohl in einem minimalen als auch in einem komplexen Medium eine Detoxifikationsaktivität aufweisen.

##### 5. Ochratoxinabbau (OTA) durch Lyophilisate in stimuliertem Darmmilieu

###### Testmodell A

Mit diesem Modell werden Lyophilisate der Hefestämme DSM 14153, DSM 14154, DSM 15155, DSM 14156 und DSM 14162 sowie der aeroben (DSM 14170, DSM 14167, DSM 14168 und DSM 14169) und anaeroben (DSM 14197) Bakterienstämme untersucht. Schlachtfrischer Schweinedünndarm wird in ca. 15 cm lange Stücke geschnitten, die dann zu jeweils 100 ml OTA [200 ppb]-hältigem Minimalmedium gegeben wurden. Die Ansätze wurden schließlich direkt mit 1 g Lyophilisat inkubiert und bei 35 °C inkubiert. Nach 0, 6, 24 und 48 h wurden Proben für eine nachfolgende OTA-Analyse mittels HPLC gezogen und tiefgefroren (-20 °C) bis zur Analyse aufbewahrt.

Unter den Hefen erwiesen sich die Keime DSM 14153, DSM 14156 und DSM 14162 als am höchsten aktiv. Bereits nach den ersten 6 Inkubationsstunden waren 70 - 90 %, 50 - 90 % bzw. 80 - 90 % des vorhandenen Toxins transformiert (nach 24 h: 90 - 95 %). Die beiden übrigen getesteten Hefen (DSM 14154, DSM 14155) hinkten bezüglich Aktivität hinter den genannten drei Stämmen her (0 - 20 % Abbau nach 6 h; 30 - 50 % nach 24 h; 80 % nach 48 h).

Bei den aeroben Bakterien war der Keim DSM 14168 am besten; nach 6 h waren bereits 50 - 100 % des vorhandenen Toxins umgesetzt, nach 24 h 80 - 100 %. Auch DSM 14169 erwies sich als durchaus "akzeptabel": nach 6 h waren 0 - 90 % OTA detoxifiziert, nach 24 h 70 - 95 %. Die beiden übrigen Keime waren deutlich leistungsschwächer (0 - 40 % nach 6; 50 - 60 % nach 24 h; 60 - 80 % nach 48 h).

Das anaerobe Dünndarmisolat DSM 14197 degradierte das vorhandene Mykotoxin nach 6 Inkubationsstunden in einem Ausmaß von 0 bis 60 %; nach 24 h waren zwischen 50 und 100 % OTA umgesetzt.

Analoge Untersuchungen wurden mit folgenden Keimen durchgeführt:

Dünndarmisolat F6:	90 - 95 % nach 24 h
Dickdarmisolat Di 1-8:	80 - 95 % nach 24 h
Trichosporon ovoides:	40 - 50 % nach 24 h
Triosporon dulcitum:	50 - 90 % nach 24 h
Cryptococcus curvatus:	40 - 50 % nach 24 h
Trichosporon laibachii:	50 % nach 24 h
55 Stenotrophomonas nitritreducens:	60 - 95 % nach 24 h

Stenotrophomonas sp.: 50 - 70 % nach 24 h

Dieses Modell zeigte, daß OTA in einem Puffermilieu, das einen Darmabschnitt mit dem entsprechenden Milieu (Nährstoffe und die Darmflora) enthält, durch die hergestellten Produkte deaktiviert werden kann.

#### Testmodell B

Mit diesem Modell wurden Lyophilisate der Hefestämme DSM 14153, DSM 14156 und DSM 14162 sowie der Bakterienstämme DSM 14168 (aerob), DSM 14169 (aerob) und DSM 14197 (anaerob) untersucht.

Schlachtfrischer Schweinedünndarm wurde in ca. 25 cm lange Stücke geschnitten, die mittels Bindfaden an ihren Enden zugebunden wurden. 1 g des zu untersuchenden Produkts wurde in ein 50 ml Zentrifugenrörchen eingewogen und in 20 ml OTA [200 ppb]-hältigem Testmedium (aerobe Keime und Hefen → Minimalmedium; anaerobe Keime → Anaerobpuffer) resuspendiert. Von der gut gemischten Suspension ausgehend wurden optional auch Zehnfachverdünnungen hergestellt. Die gemischte(n) Suspension(en) wurden dann jeweils direkt in ein Darmstück injiziert. Nach dem Ziehen der Nullprobe direkt aus dem Darmstück wurde dieses in einer 250 ml Pyrexflasche hängend (d.h. der Bindfaden eines Endes wurde mit dem Schraubverschluß der Flasche befestigt) bei 35 °C inkubiert. Nach 6, 24 und 48 h wurden weitere Proben für eine nachfolgende OTA-Transformationsanalyse mittels HPLC gezogen.

Im Falle der Hefen (ca. 10<sup>7</sup> KBE/ml) wurde nach 6 h ein OTA Abbau von bis zu 90 % (DSM 14153) registriert. Nach spätestens 24 h konnten dann für alle Produkte vergleichbar hohe Aktivitäten nachgewiesen werden (80 - 100 %).

Auch mit den zehn- und hundertfachen Verdünnungen der Lyophilisate wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Mit den beiden aeroben Bakterien DSM 14168 und DSM 14169 wurden ähnliche Resultate erhalten. Nach 6 h waren 20 - 60 % des OTA transformiert, nach 24 h 80 - 95 %. Der anaerobe Keim DSM 14197 wies nach 6 h eine Abbauleistung zwischen 40 und 50 % auf, die nach 24 h auf 90 % gesteigert werden konnte. Darmabschnitte, die mit OTA, aber ohne Produkte inkubiert wurden, zeigten keine Entgiftungsaktivität.

Mit diesen Versuchen wird bewiesen, daß die Ochratoxin-detoxifizierenden Mikroorganismen dieses Toxin auch in einem einem Darm entsprechenden Milieu abbauen können. Dadurch ist insbesondere die Verwendung der Mikroorganismen als Nahrungs- bzw. Futtermittelzusatz zur Detoxifizierung von Ochratoxinen eindeutig nachgewiesen.

#### 6. Detoxifizierung von Lebens- und Futtermitteln

Die Ochratoxin entgiftenden Mikroorganismen wurden entsprechend den Beispielen 1 bis 3 unter den entsprechenden Bedingungen ca. 66 h lang angezüchtet. Je 25 ml der Suspensionen wurden für 15 min bei 3210 x g abzentrifugiert und in einem adäquaten Volumen des Minimalmediums, welches mit 200 ppb OTA versetzt war, aufgenommen. Die entstehende Suspension wurde zur Inkulation von 25 g bzw. 25 ml Lebensmittel, Kaffeepulver, Maisgrieß, Weizengrieß, Bier und Wein, herangezogen. Nach sorgfältiger Vermengung des Lebensmittels mit der Mikroorganismensuspension wurde eine Probe (= Nullprobe) gezogen. Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 9 Tage bei 25 °C. Danach wurden 5 g der Probe im Vergleich zur Nullprobe analysiert. Zusätzlich wurden Blindwerte mitinkubiert. Diese wurden mit OTA, jedoch ohne Mikroorganismen versehen. Zur Analyse des Ochratoxin in den flüssigen Lebensmitteln wurde genau 1 ml des von den Mikroorganismen befreiten Lebensmittels mit 0,5 ml 1 M Phosphorsäure angesäuert und mit 5 ml Methylenchlorid extrahiert. 5 ml des Extraktes wurden unter Stickstoff eingetrocknet. Jede Probe wurde zweimal aufgearbeitet, der Rückstand nach dem Trocknen wurde einmal in Acetonitril/Wasser/Essigsäure (45:54:1) und einmal in Toluol/Essigsäure

(99:1) aufgenommen. Die Analysen der Proben erfolgten sowohl mittels HPLC als auch mittels TLC. Bei der Analyse des Weizengrießes wurden 5 g der Probe in eine 100 ml Schottflasche eingewogen und mit 20 ml Acetonitril/Wasser (60:40) bei 170 U/min eine Stunde lang geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren wurde dieser Extrakt direkt mittels HPLC analysiert. Die Aufarbeitung für die OTA-Analysen aus Maisgrieß und Kaffee war etwas aufwendiger. Hier wurden 5 g der Probe in eine 100 ml Schottflasche eingewogen und mit 20 ml Acetonitril:Wasser (60:40) eine Stunde lang geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren wurden 4 ml des Extraks mit 44 ml PBS-Puffer (0,1 % Tween 20) versetzt und auf eine Immunoaffinitätssäule aufgegeben. Anschließend erfolgte die HPLC-Analyse. Es wurde sowohl die Abnahme des OTA als auch das Auftreten des Metaboliten OT<sub>a</sub> bestimmt. In den Kaffee- und Maisproben konnte aufgrund der eingesetzten Säulenaufreinigung kein OT<sub>a</sub> nachgewiesen werden. Folgende Abbauraten konnten erhalten werden:

Stamm	OTA-Reduktion in Prozent				
	Bier	Wein	Mais	Weizen	Kaffee
DSM 14153	100 (+)	99 (+)	94 (+)	100 (+)	~67 (+)
DSM 14154	100 (+)	94 (+)	50 (+)	100 (+)	0 (-)
DSM 14155	30 (+)	0 (-)	99 (+)	100 (+)	0? (-)
DSM 14156	100 (+)	95 (+)	96 (+)	100 (+)	30 (+)
DSM 14162	83 (+)	12 (+)	100 (+)	100 (+)	0 (-)
DSM 14170	75 (+)	0 (-)	0 (-)	89 (+)	0 (-)
DSM 14167	100 (+)	4 (+)	39 (+)	~90 (+)	0 (-)
DSM 14168	100 (+)	0 (-)	50 (+)	94 (+)	0 (-)
DSM 14169	100 (+)	0 (-)	0 (-)	91 (+)	0 (-)
DSM 14171	100 (+)	0 (-)	79 (+)	81 (+)	0 (-)

### 7. Abbau von Mykotoxinen

Die Mikroorganismen wurden ca. 66 h lang angezüchtet. Danach wurden diese abzentrifugiert (3210 x g, 15 min, Raumtemperatur) und die erhaltenen Pellets im Minimalmedium resuspendiert. Dem Minimalmedium wurden 1 ppm Deoxynivalenol, 1 ppm Fumonisins B<sub>1</sub>, 1 ppm Zearalenon, 200 ppb Aflatoxin B<sub>1</sub> und 2 ppm Citrinin zugesetzt. Bevor die Ansätze bei 30 °C inkubiert wurden, erfolgte eine Probenahme ("Nullprobe"). Die Inkubationsdauer betrug 96 h. Die Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei für die HPLC-Analyse einmal der Überstand (nach Zentrifugation) und einmal der gesamte Ansatz untersucht wurde. Zur Aufreinigung wurden 3 ml der Überstände bzw. 2 ml der gesamten Probe auf 15 g Extrelutmaterial gegeben. Nach 15 min wurden die Proben mit 40 ml Ethylacetat eluiert. Je 7 ml des Ethylacetats wurden eingetrocknet und im entsprechenden Laufmittel aufgenommen. Die Analyse von Aflatoxin B<sub>1</sub> und Fumonisins B<sub>1</sub> erfolgte nach vorangegangener Derivatisierung.

Die Proben nach 96 h wurden im Vergleich zu den Proben zu Beginn auf Abbau der entsprechenden Toxine untersucht. Dazu wurden bei DON, ZON und AFB<sub>1</sub> sowohl die Überstände (Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugation) als auch die Gesamtprobe (mit Biomasse) analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

	Stämme	ZON-Abbaurate [%]		FB <sub>1</sub> -Abbaurate [%]		AFB <sub>1</sub> -Abbaurate [%]		CIT-Abbaurate [%]
		Überstand	gesamt	Überstand	Überstand	gesamt	Überstand	Überstand
5	DSM 14170	0	24	0	0	0	0	100
	DSM 14167	0	28	0	0	10	0	0
10	DSM 14168	0	32	0	0	10	0	0
	DSM 14169	88	90	0	8	46	0	0
	DSM 14171	0	43	0	0	24	0	0
15	DSM 14153	100	100	19	20	13	0	0
	DSM 14154	19	67	22	64	63	0	0
	DSM 14155	81	100	29	20	38	0	0
	DSM 14156	100	100	6	0	61	0	0
20	DSM 14162	17	62	8	0	0	0	0

Aus diesen Versuchen zeigt sich deutlich, daß einige Mykotoxine, wie Zearalenon (ZON), Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), mit den Mikroorganismen gemäß der vorliegenden Erfindung teilweise extrem gut abgebaut werden können. Citrinin (CIT) konnte lediglich mit dem Bakterium Sphingomonas sp. (DSM 14170) zu 100 % abgebaut werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß mit den Mikroorganismen gemäß der vorliegenden Erfindung insbesondere ein Abbau von Ochratoxinen in Nahrungs- und Futtermitteln und auch im Darmmilieu sehr gut möglich ist, wobei jedoch auch ein Abbau von Zearalenon, Citrinin und dgl. teilweise gute Ergebnisse zeigte.

### Patentansprüche:

35. 1. Mikroorganismus, welcher Ochratoxine sowie Ochratoxine und Zearalenone entgiftet, indem er die Phenylalaniningruppe der Ochratoxine abspaltet bzw. Zearalenone abbaut, *dadurch gekennzeichnet*, daß als Mikroorganismen aerobe oder anaerobe, detoxifizierende Bakterien, gewählt aus: Sphingomonas sp. DSM 14170 und DSM 14167, Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168, Stenotrophomonas sp. DSM 14169, Ralstonia eutropha DSM 14171 und Eubacterium sp. DSM 14197, oder Hefen, gewählt aus: Trichosporon spec. nov. DSM 14153, Cryptococcus sp. DSM 14154, Rhodotorula yarrowii DSM 14155, Trichosporon mucoides DSM 14156 und Trichosporon dulcitum DSM 14162, eingesetzt sind.
45. 2. Mikroorganismus nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, daß die Bakterien und/oder Hefen insbesondere in an sich bekannter Weise durch Lyophilisieren, Sprühtrocknen oder Mikroverkapseln stabilisiert sind.
50. 3. Verwendung von Bakterien, gewählt aus: Sphingomonas sp. DSM 14170 und DSM 14167, Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168, Stenotrophomonas sp. DSM 14169, Ralstonia eutropha DSM 14171 und Eubacterium sp. DSM 14197 und/oder Hefen, gewählt aus: Trichosporon spec. nov. DSM 14153, Cryptococcus sp. DSM 14154, Rhodotorula yarrowii DSM 14155, Trichosporon mucoides DSM 14156 und Trichosporon dulcitum DSM 14162 zur Detoxifizierung von Ochratoxinen in Nahrungsmitteln und/oder Futtermitteln durch Abspaltung der Phenylalaniningruppe des Ochratoxins.

4. Verwendung nach Anspruch 3 zur Entgiftung von Ochratoxinen in Nahrungsmitteln und/oder Futtermitteln mit der Maßgabe, daß die Bakterien auch zur Entgiftung von Zearalenon(en) in diesen Nahrungsmitteln und/oder Futtermitteln eingesetzt werden.
5. 5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, *dadurch gekennzeichnet*, daß *Trichosporon spec. nov. DSM 14153, Eubacterium sp. DSM 14197 oder Stenotrophomonas nitritreducens DSM 14168* zur Detoxifizierung von Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen in Nahrungsmitteln und/oder Futtermitteln eingesetzt werden.
10. 6. Verwendung nach Anspruch 3, 4 oder 5, *dadurch gekennzeichnet*, daß Mischkulturen der Bakterien und/oder Hefen zur Detoxifizierung von Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen in Nahrungsmitteln und/oder Futtermitteln eingesetzt werden.
15. 7. Verfahren zur biologischen Entgiftung von Ochratoxinen sowie Ochratoxinen und Zearalenonen in Nahrungs- und Futtermitteln mit einem Mikroorganismus, *dadurch gekennzeichnet*, daß ein Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 oder 2 mit den Nahrungs- bzw. Futtermitteln in einer Menge von 0,01 Gew.-% bis 1 Gew.-%, insbesondere 0,05 Gew.-% bis 0,5 Gew.-%, vermischt wird.
20. 8. Verfahren nach Anspruch 7, *dadurch gekennzeichnet*, daß die Nahrungs- oder Futtermittel durch Rühren in einer wäßrigen Suspension des Mikroorganismus, enthaltend 20 bis 99 Gew.-%, insbesondere 35 Gew.-% bis 85 Gew.-% Wasser bei Temperaturen von 10 bis 60 °C, insbesondere 15 bis 45 °C, für 2 min bis 12 h, insbesondere 5 min bis 2 h, behandelt wird.
25. 9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, *dadurch gekennzeichnet*, daß die Bakterien oder Hefen als zellfreier Extrakt oder Rohextrakt eingesetzt werden.
30. 10. Verfahren nach Anspruch 9, *dadurch gekennzeichnet*, daß der Mikroorganismus als zellfreier Extrakt in einer Lösung, insbesondere einer wäßrigen Lösung, eingesetzt wird.
35. 11. Verfahren nach Anspruch 9, *dadurch gekennzeichnet*, daß der Rohextrakt aus den Bakterien und Hefen mittels Ultraschall, einen enzymatischen Aufschluß, durch eine Kombination aus Schockfrieren und Auftauen, Durchflußhomogenisator, French-Press, Autolyse bei hoher NaCl-Konzentration und/oder Kugelmühle erhalten wird.
40. 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, *dadurch gekennzeichnet*, daß der Mikroorganismus in gepufferter Lösung, enthaltend Acetat-, Citrat-, Phosphat- oder Trishydrochloridpuffer mit pH-Werten zwischen 1 und 12, insbesondere zwischen 2 und 8, eingesetzt wird.

## Keine Zeichnung