



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 161 182 A3

3(51) C 12 P 17/16
C 12 P 19/26

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 P / 223 321

(22) 14.08.80

(45) 02.05.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Bocker, Harald, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Gräfe, Udo, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Thrum, Heinz, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Bradler, Gertraud, Dr. rer. nat.; Schicht, Gerald; Noack, Dieter, Dr. habil. Dipl.-Phys., DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikums der Streptothricin-Gruppe

(57) Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur fermentativen Herstellung des zur Gruppe der Streptothricine gehörenden Antibiotikums Nourseothricin, welches in Kulturen von *Streptomyces noursei* IMET JA 3890b gebildet wird. Nourseothricin ist in vitro wirksam gegen Gram-positive und -negative Bakterien sowie gegen Mykobakterien; es zeigt auch antivirale und taeniacidale Wirkung. Es wurde gefunden, daß Zusätze von Hemmstoffen der Atmungskette, wie Alkaliazide, Brenzkatechin sowie Amytal (Äthylisoamylbarbitursäure), weiterhin auch von Hemmstoffen des Aminosäuretransports in der lebenden Zelle, wie wasserlösliche anorganische Zinksalze sowie β -Alanin, einzeln oder im Gemisch dem Fermentationsmedium der Hauptkultur spätestens bis zur exponentiellen Wachstumsphase des Nourseothricin-Bildners ein- oder mehrmalig zugesetzt, eine deutliche fördernde Wirkung auf die Nourseothricin-Biosynthese ausüben, ohne die biologischen Eigenschaften des Fermentationsproduktes ändernd zu beeinflussen.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikums der Streptothricin-Gruppe durch Züchtung eines Nourseothricin-bildenden Streptomycetenstammes unter submersen aeroben Kulturbedingungen in einem geeigneten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie ausreichenden Konzentrationen an Mineralsalzen enthaltenden flüssigen Nährmedium, **gekennzeichnet dadurch**, daß dem Nährmedium Hemmstoffe der Atmungskette vom Typ der Alkalizide, des Brenzkatechins und/oder des Amytals (Äthylisoamylbarbitursäure) und/oder Hemmstoffe des Aminosäuretransports in der lebenden Zelle vom Typ wasserlöslicher Zinksalze und/oder β -Alanin einzeln oder im Gemisch in fester oder flüssiger Form zugesetzt werden, und daß der Zeitpunkt des ein- oder mehrmaligen oder kontinuierlichen Zusatzes vor der Sterilisation des Nährmediums beziehungsweise vor oder nach der Beimpfung desselben, spätestens aber noch während der exponentiellen Wachstumsphase der Kultur liegt.

Hierzu 4 Seiten Tabellen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur fermentativen Gewinnung von Nourseothricin, ein zur Gruppe der Streptothricine gehörendes Antibiotikum.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Das von BRADLER und THRUM (1963/1965) aus der Kultur einer Variante von Streptomyces noursei ATCC 11455 isolierte Antibiotikum Nourseothricin ist in vitro wirksam gegen Grampositive und -negative Bakterien sowie gegen Mykobakterien; es zeigt auch antivirale und taeniocidale Wirkung. Hinsichtlich der chemischen Struktur ist Nourseothricin im wesentlichen ein Gemisch der Streptothricine F und D (GRÄFE et al. 1974).

Der das Antibiotikum Nourseothricin bildende Streptomycetenstamm ist unter der Bezeichnung Streptomyces noursei IMET JA 3890b in der Stammsammlung des Zentralinstituts für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR hinterlegt.

Nach den in der Literatur angegebenen Verfahren (BRADLER und THRUM, 1963/1965; BOCKER und THRUM, 1966; GRÄFE et al., 1974) erfolgt die Kultivierung unter aeroben Bedingungen. Hierzu wird an Erde lyophil getrocknetes Sporenmaterial dieses Streptomyces-Stammes auf geeignete Agarnährböden aufgebracht. Nach 6- bis 10tägiger Bebrütung bei 28 bis 30°C wird der so gewachsene versportete Mycelrasen zum Beimpfen von flüssigen sterilen Nährmedien verwendet. Solche Nährmedien bestehen aus Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie anorganischen Salzen. Als Kohlenstoffquellen können verschiedene pflanzliche Stärkemehle, beispielsweise Kartoffelstärke, Glucose und/oder Glycerin eingesetzt werden. Als Stickstoffquellen kommen insbesondere Sojamehl, verschiedene Aminosäuren und/oder Ammoniumsalze in Betracht. Die für die Antibiotikumbildung günstigste Azidität zu Beginn der Fermentation liegt im Bereich von pH 6,0 bis 6,7.

Die submerse Kultivierung des Streptomyces noursei IMET JA 3890b kann in Steilbrustflaschen oder Stehrundkolben verschiedenen Inhalts als Schüttelkultur sowie in sterilbelüfteten und gerührten Fermentern aus korrosionsbeständigem Material bei Temperaturen von 25 bis 30°C, vorzugsweise von 26 bis 28°C, durchgeführt werden. Die submerse Kultur zur Anzucht des vegetativen Impfmateri als dauert 24 bis 72 Stunden, insbesondere 48 Stunden, und der Prozeß der Hauptkultur 72 bis 144 Stunden.

Die Isolierung des Antibiotikums erfolgt aus dem vom Mycel befreiten Kulturfiltrat durch Adsorption an geeignete Kationenaustauscher, beispielsweise Wofatit CP-300, und nachfolgender Elution mit verdünnten Säuren wie von BRADLER und THRUM (1963), GRÄFE et al. (1974) und GRÄFE et al. (1977a) beschrieben.

Auf dem bekannten Nährsubstrat (BRADLER u. THRUM, 1965) bildet der Stamm Streptomyces noursei IMET JA 3890b nur verhältnismäßig geringe Mengen an Nourseothricin (unter 100 µg/ml). Durch Zusatz von Aminoarylkarbonsäuren, insbesondere von 5 bis 10 mM o-Aminobenzoessäure, zum Beginn der Hauptkultur kann die Fermentationsausbeute unter den bekannten technischen Bedingungen um etwa das Fünf- bis Zehnfache gesteigert werden (BOCKER u. THRUM, 1966; THRUM und BOCKER, 1965; GRÄFE et al., 1974).

Nach den Feststellungen von GRÄFE et al. (1974, 1977b, 1978, 1979) reprimieren o-Aminobenzoessäure und/oder andere Aminoarylkarbonsäuren spezifisch die Bildung von Cytochrom des a-Typs (Cytochrom-Oxydasen) und hemmen dadurch indirekt sowohl den Aminosäuretransport aus dem Nährmedium in das Mycel als auch die oxydative Desaminierung der Aminosäuren in den Zellen des Nourseothricin-Bildners. Hierdurch wird einerseits eine Repression des Sekundärstoffwechsels durch ein zelluläres Überangebot an Stickstoff-Kataboliten vermieden. Andererseits wird auf diese Weise verhindert, daß als Prekursoren des Nourseothricins dienende Aminosäuren des Mediums vom Antibiotikum-Bildner während dessen Wachstumsphase weitgehend aufgebraucht werden. Diese Aminosäuren sind somit dem Sekundärstoffwechsel im Verlaufe der Nourseothricinbildung besser verfügbar, da für die Bildung von Biomasse bevorzugt die anorganische Stickstoffquelle (Ammonium-N) genutzt wird.

Die fermentative Nourseothricin-Produktion unter Verwendung von o-Aminobenzoessäure, die bekanntermaßen zwar eine wesentliche Steigerung der Fermentationsausbeute ermöglicht, weist jedoch die folgenden Nachteile auf, die insbesondere einer großtechnischen Anwendung entgegen stehen:

- Der notwendige Einsatz größerer Mengen von Aminoarylkarbonsäuren beeinflusst die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens ungünstig infolge der Kosten für solche Zuschlagstoffe
- Da eine Hitzesterilisation bzw. chemische oder Strahlensterilisation der wässrigen Aminoarylkarbonsäure-Salzlösungen wegen der Zersetzung der Aminoarylkarbonsäuren unter Bildung toxischer Umwandlungsprodukte nicht in Betracht kommen kann, ist zur notwendigen Entkeimung solcher Lösungen nur die Sterilfiltration möglich. Diese ist jedoch verhältnismäßig aufwendig
- Das Vorhandensein von Aminoarylkarbonsäuren in den Abläufen der Chromatographiesäulen erschwert die biologische Abwasserreinigung.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung beinhaltet das Ziel, Nourseothricin ökonomisch herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein technisch günstiges Verfahren anzugeben, das die industrielle Produktion von Nourseothricin ohne Einsatz von Aminoarylkarbonsäuren ermöglicht.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Zusätze von Hemmstoffen der Atmungskette, beispielsweise Natriumazide bzw. andere Alkaliazide, Brenzkatechin sowie Amytal (= Äthylisoamylbarbitursäure), und/oder auch Hemmstoffe des Aminosäuretransports in der lebenden Zelle, beispielsweise wasserlösliche Zinksalze oder β -Alanin, der Hauptkultur zum Zeitpunkt der Beimpfung zugesetzt, eine ähnliche fördernde Wirkung auf die Biosynthese von Nourseothricin ausüben, ohne die biologischen Eigenschaften des Fermentationsproduktes ändernd zu beeinflussen. Die hierzu erforderlichen Konzentrationen an einer dieser Substanzen liegen in den Bereichen 0,025 mM bis 0,25 mM, hauptsächlich um 0,15 mM (Natriumazid) bzw. 0,15 mM bis 1,75 mM, hauptsächlich um 0,50 mM bis 0,75 mM (Zinksulfat und β -Alanin) oder 0,25 mM bis 2,00 mM, hauptsächlich um 0,4 mM bis 1,5 mM (Brenzkatechin oder Amytal).

Das Grundmedium für die Hauptkultur muß folgende Anforderungen erfüllen:

- Anwesenheit einer begrenzten Menge an leicht verwertbaren Kohlenstoffquellen, beispielsweise Glucose, zur Gewährleistung einer stufenlosen Adaptation an komplexe Kohlenstoffquellen.
 - Vorhandener Überschuß an komplexen Kohlenstoffquellen, beispielsweise Stärke, zur Gewährleistung eines ausreichenden Angebots an Kohlenstoff-Kataboliten während der gesamten Fermentation.
 - Limitierte Bereitstellung von komplexen Stickstoffquellen, beispielsweise Sojamehl, zur Einschränkung des Katabolismus der Aminosäuren während der gesamten Fermentation.
- Bereitstellung einer hinreichenden Menge von anorganischen Stickstoffquellen, beispielsweise Ammoniumnitrat, zur Befriedigung der diesbezüglichen Nährstoffsprünge des Nourseothricin-Bildners während dessen Wachstumsphase in der Hauptkultur.

Folgende Fermentationsmedien werden für das Verfahren verwendet:

Medium Bo-30: 2,9% Glucose

1,3% Sojamehl, entölt
0,5% Natriumchlorid
0,3% Calciumcarbonat
ad 100 Leitungswasser
pH 6,5 (vor Sterilisation)

Medium Bo-31: 3,0% Maisstärke

0,3% Glucose
0,7% Sojamehl, entölt
0,5% Ammoniumnitrat
0,2% Magnesiumsulfat, kristallin
0,5% Natriumchlorid
0,3% Calciumkarbonat
ad 100 Leitungswasser
pH 6,0 (vor Sterilisation)

Medium Bo-32: 3,2% Kartoffelstärke

2,9% Glucose
1,4% Sojamehl, entölt
0,7% Ammoniumnitrat
0,2% Magnesiumsulfat, kristallin
0,1% Natriumchlorid
0,6% Calciumcarbonat
ad 100 Leitungswasser
pH 6,0 (vor Sterilisation)

Diese Grundmedien, für die Hauptkultur eingesetzt, ermöglichen eine wesentlich höhere Fermentationsausbeute an Nourseothricin im Vergleich mit dem bekannten Fermentationsmedium.

Beim Vorliegen von Natriumazid, bzw. anderen Alkaliaziden, Brenzkatechin, Amytal, Zinksulfat und/oder β -Alanin bzw. anderen Hemmstoffen der Atmungskette oder des Aminosäuretransports in der lebenden Zelle, diesem Grundmedium zum Zeitpunkt der Beimpfung der Hauptkultur einzeln oder im Gemisch zugesetzt, wird die Nourseothricin-Bildung noch um das Zwei- bis Zehnfache erhöht. Die hierzu erforderlichen Konzentrationen an solchen als Zusätze dienenden Substanzen liegen in den gleichen Bereichen, wie sie bereits weiter vorn angegeben sind.

Nourseothricin kann in an sich bekannter Weise durch Adsorption mit Aktivkohle und Kationenaustauschern (stark und schwach sauer) aus dem Kulturfiltrat gewonnen werden. Das bevorzugte Verfahren beruht auf der Adsorption an der Alkaliform von schwach sauren Kationenaustausch-Härzen. Die Elution der so erhaltenen Adsorbate wird zweckmäßig mit wäßrigen oder alkoholischen Lösungen von Mineralsäuren ausgeführt. Aus den mineralsauren Eluaten wird in der Regel reines Nourseothricin-Salz gewonnen.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird durch folgende Ausführungsbeispiele erläutert, ohne sie jedoch hierauf zu beschränken.

1. Eine lyophil an Erde getrocknete Sporenkonserve des Stammes *Streptomyces noursei* IMET JA 3890b wird auf ein geeignetes Agarmedium, beispielsweise Emerson-Agar, ausgestreut. Nach etwa siebentägiger Bebrütung bei 30°C werden etwa 2 cm² große Stücken des Mycelrasens herausgeschnitten und damit jeweils ein Kulturansatz der 1. Vorzucht beimpft.

Das Medium dieser Vorzucht hat folgende Zusammensetzung:

4,0% Glucose; 1,5% Sojamehl, entölt; 0,03% KH₂PO₄; 0,5% NaCl; 0,3% CaCO₃; Leitungswasser ad 100; pH 6,5–6,9 (vor Sterilisation).

Dieses Medium ist in 500 ml fassende, mit Wattestopfen verschlossene Steilbrustflaschen in Mengen zu jeweils 50 ml abgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch 35 Minuten langes Erhitzen auf 120°C im Autoklaven.

Die beimpften Ansätze werden 48 Stunden als Schüttelkulturen bei 29°C bebrütet. Mit jeweils 3 ml der so erhaltenen Vorzuchten werden die Kulturansätze der Hauptkultur beimpft.

Für die Hauptkultur werden folgende Grundmedien eingesetzt:

Medium Bo-30: 2,9% Glucose; 1,3% Sojamehl, entölt; 0,5% NaCl; 0,3% CaCO₃; Leitungswasser ad 100; pH 6,5 (vor Sterilisation)

Medium Bo-31: 3,0% Maisstärke; 0,3% Glucose; 0,7% Sojamehl, entölt; 0,5% NH₄NO₃; 0,2% MgSO₄·7H₂O; 0,5% NaCl; 0,3% CaCO₃; Leitungswasser ad 100; pH 6,0 (vor Sterilisation).

Die Nährmedien der Hauptkultur werden in Mengen zu jeweils 80 ml in 500 ml fassende, mit Wattestopfen verschlossene Steilbrustflaschen abgefüllt und 35 Minuten bei 120°C im Autoklaven sterilisiert.

Entsprechend des Versuchsplanes werden die so vorbehandelten Ansätze der Hauptkultur zum Zeitpunkt der Beimpfung mit sterilfiltrierten, wäßrigen, neutralen Lösungen der betreffenden in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Substanzen (maximal 3,0 ml Zusatz/80 ml Medium) versetzt. Zu Vergleichszwecken wird je eine zusätzliche Gruppe von Kulturansätzen nach der gleichen Verfahrensweise mit ortho-Aminobenzoessäure (Natriumsalz) auf die für die Förderung der Nourseothricin-Bildung als besonders günstig bekannten Konzentrationen eingestellt. Die Versuche werden in fünffacher Wiederholung durchgeführt.

Die während der 72- bis 120stündigen Bebrütung der Hauptkulturen bei 26°C mit Hilfe des Lochplattendiffusionstestes unter Verwendung von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 als Testkeim ermittelten durchschnittlichen maximalen Nourseothricin-Konzentrationen sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

2. Das vegetative Impfmateriale des Nourseothricin-Bildners wird wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben angezogen. Mit je 10 ml der 48stündigen Kulturlösung werden die Ansätze der 2. Vorzucht beimpft. Dieses Medium hat die gleiche Zusammensetzung wie das der 1. Vorzucht und wird auch in gleicher Weise sterilisiert. Das Medium ist in Anteilen zu je 400 ml in 2500 ml fassende, mit Wattestopfen verschlossene Steilbrustflaschen abgefüllt. Deren Bebrütung erfolgt 24 Stunden bei 29°C als Schüttelkultur. Mit jeweils 800 ml der so erhaltenen 2. Vorzucht werden die in Anteilen von je 20 Liter in vorher hitzesterilisierte 30 Liter-fassende Glasfermentoren abgefüllte sterile Grundmedien der Hauptkultur beimpft. Verwendet werden hierzu die im Ausführungsbeispiel 1 angegebenen Medien Bo-30 und Bo-31, die als Entschäumer noch zusätzlich 0,3% Sonnenblumenöl enthalten. Unmittelbar nach dem Beimpfen erfolgt der Zusatz der sterilfiltrierten, wäßrigen, neutralen Lösungen der in Tabelle 3 aufgeführten Substanzen (maximal 200 ml Zusatz/20 Liter Medium).

Die Fermentationsansätze werden 120 Stunden bei einer Temperatur von 26 bis 28°C und einer Belüftungsrate von 20 Liter Luft/Minute (bei Normaldruck) unter Rühren (440 U/min) bebrütet. Als Entschäumer wird im Bedarfsfalle steriles Sonnenblumenöl in der technisch erforderlichen Menge zugesetzt.

Das während der Fermentation gebildete Nourseothricin wird täglich wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mikrobiologisch bestimmt. Die ermittelten Testwerte finden sich in der Tabelle 3.

3. Das vegetative Impfmateriale des Nourseothricin-Bildners wird in der gleichen Weise und unter Verwendung des gleichen Nährmediums, wie in den Ausführungsbeispielen 1 und 2 beschrieben, angezogen.

Mit acht 24stündigen Schüttelkulturen der 2. Vorzucht wird ein mit 150 Liter hitzesterilisiertem Medium (60 Minuten bei 125°C) der vorgenannten Zusammensetzung gefüllter, mit Vorrichtungen zur Sterilbelüftung und einem Rührwerk ausgestatteter Edelstahlfermenter (200 Liter Bruttovolumen) beimpft. Die Kultivierung erfolgt bei 26 bis 28°C, einer Geschwindigkeit des Rührwerks von 375 U/min und einer Belüftungsrate von 1 Liter Luft pro 1 Liter Kulturlösung in der Minute (bei Normaldruck).

Nach 20- bis 24stündiger Bebrütung werden 100 Liter dieser Kultur zur Beimpfung von 600 Liter Nährmedium der Hauptkultur eingesetzt. Dieses ist vorher im Fermenter der Hauptkultur (1000 Liter Bruttovolumen; mit Vorrichtungen zum Rühren, Sterilbelüften und Temperieren) durch 1stündiges Erhitzen auf 130°C sterilisiert worden.

Das hierbei eingesetzte Nährmedium Bo-32 hat folgende Zusammensetzung:

3,2% Kartoffelstärke
2,9% Glucose
1,4% Sojamehl, entölt
0,7% Ammoniumnitrat
0,2% Magnesiumsulfat, kristallin
0,1% Natriumchlorid
0,6% Calciumcarbonat
0,3% Sonnenblumenöl
0,048% Zinksulfat, kristallin
ad 100 ml Leitungswasser
pH 5,9-6,1 (vor Sterilisation)

Das Zinksulfat wird dem Fermentationsmedium vor der Sterilisation zugesetzt.

Die Bebrütung dieser Hauptkultur erfolgt über einen Zeitraum von 144 Stunden bei 26 bis 28°C, einer Geschwindigkeit des Rührwerks von 290 U/min und einer Belüftungsrate von 1 Liter Luft pro 1 Liter Kulturlösung in der Minute (Druck 0,14 bis 0,16 MPa).

Zur Schaumbekämpfung wird nach Bedarf steriles, wasserhaltiges Sonnenblumenöl eingesetzt.

Das während der Fermentation gebildete Nourseothricin wird täglich wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mikrobiologisch bestimmt. Die ermittelten Testwerte sind in der Tabelle 4 angegeben.

Zur Isolierung des Antibiotikums werden 500 Liter der Kulturlösung mit einem Nourseothricin-Gehalt von 4000 µg/ml mit Oxalsäure auf pH 4,0 angesäuert und durch Separieren von den Feststoffen befreit. Anschließend wird das Filtrat mit 30%iger Natronlauge neutralisiert und zum Abtrennen nachträglicher Ausflockungen erneut separiert. Zur Adsorption des Antibiotikums wird das neutralisierte Kulturfiltrat mit einer Laufgeschwindigkeit von 70 Liter/Stunde über eine mit 70 Liter Wofatit CP-300 (Na-Form) gefüllte Säure filtriert. Das Adsorbat wird mit 50 Liter entionisiertem Wasser, nachfolgend mit 0,1 N Essigsäure bis zur Azidität pH 5,5 des Durchlaufs und noch mit 15 Liter Wasser gewaschen. Die Elution des Antibiotikums erfolgt mit 50 Liter einer 1,0N Salzsäure und nachfolgend mit entionisiertem Wasser, wobei das Eluat in zwei Fraktionen

getrennt aufgefangen wird: Fraktion I bis zum pH-Umschlag des Eluats nach sauren Werten und Fraktion II als saures Eluat.

Die neutrale Fraktion I (ca. 50 Liter) wird unmittelbar unter Vakuum bei maximal 40°C bis zum Sirup (ca. 4 Liter) eingedampft. Dieser Rückstand wird in 60 Liter Methanol rückgelöst. Nach dem Filtrieren der methanolischen Lösung wird durch portionsweises Unterrühren von insgesamt 260 Liter Aceton das Nourseothricin-Hydrochlorid ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 13 Liter Methanol/Aceton (1:3; v:v) und anschließend noch 8 Liter absolutem Aceton gewaschen und im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure oder Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 740 g weißes, amorphes Nourseothricin-Hydrochlorid mit einem Nourseothricin-Gehalt von 950 Einheiten/mg und 5,4% Sulfatasche.

Die salzsaure Fraktion II (ca. 15 Liter) wird unter Umrühren portionsweise mit dem Anionenaustauscher Wofatit L-150 (OH-Form) versetzt, bis die Lösung neutral reagiert. Nach dem Abfiltrieren des Ionenaustauschers wird das Filtrat in gleicher Weise wie die Fraktion I konzentriert und weiterverarbeitet, wobei die einzusetzenden Lösungsmittelmengen entsprechend zu verringern sind.

Ausbeute: 100 g weißes, amorphes Nourseothricin-Hydrochlorid mit einem Nourseothricin-Gehalt von 500 Einheiten/mg und 10,0% Sulfatasche.

Tabelle 1: Förderung der Nourseothricin-Bildung in Schüttelkulturen des Stammes *Streptomyces noursei* IMET JA 3890b durch Zusätze von Natriumazid, Brenzkatechin, Amytal, Zinksulfat, β -Alanin bzw. o-Aminobenzoessäure; Medium Bo-30

Konzentration des Zusatzes (mM)	$\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin					
	Natriumazid	Brenzkatechin	Amytal	Zinksulfat	β -Alanin	o-Aminobenzoessäure
0,025	183	—	—	—	—	—
0,050	230	—	—	—	—	—
0,075	291	—	—	—	—	—
0,100	330	—	—	—	—	—
0,125	458	—	—	—	—	—
0,150	544	—	—	308	—	—
0,175	372	—	—	—	—	—
0,200	230	—	—	—	—	—
0,250	224	263	185	469	210	—
0,500	—	277	221	560	329	—
0,750	—	294	228	702	311	—
1,00	—	396	291	552	258	—
1,25	—	412	301	439	255	—
1,50	—	382	206	437	212	—
1,75	—	250	174	124	157	—
5,0	—	—	—	—	—	473
7,5	—	—	—	—	—	500
10,0	—	—	—	—	—	610
Ohne Zusatz (Kontrolle)	95					

Tabelle 2: Förderung der Nourseothricin-Bildung in Schüttelkulturen des Stammes *Streptomyces noursei* IMET JA 3890b durch Zusätze von Natriumazid, Brenzkatechin, Zinksulfat bzw. o-Aminobenzoessäure; Medium Bo-31

Konzentration des Zusatzes (mM)	$\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin			
	Natriumazid	Brenzkatechin	Zinksulfat	o-Aminobenzoessäure
0,050	961	—	—	—
0,100	1135	—	—	—
0,125	1426	—	—	—
0,150	1891	—	—	—
0,175	1085	—	—	—
0,200	657	949	—	—
0,300	—	1401	887	—
0,400	—	1984	1711	—
0,500	—	1166	1934	—
0,750	—	986	2158	—
1,00	—	868	2585	—
1,25	—	713	2604	—
1,50	—	—	2108	—
2,00	—	—	781	—
5,0	—	—	—	1934
7,5	—	—	—	1662
10,0	—	—	—	1612
Ohne Zusatz (Kontrolle)	620			

Tabelle 3: Förderung der Nourseothricin-Bildung in Kleinfemterkulturen des Stammes *Streptomyces noursei* IMET JA 3890b durch Zusätze von Natriumazid, Brenzkatechin bzw. Zinksulfat; Medien Bo-30 und Bo-31

Konzentration des Zusatzes	$\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin	
	Medium Bo-30	Medium Bo-31
0,125 mM Natriumazid	420	1835
0,500 mM Brenzkatechin	—	1690
1,250 mM Brenzkatechin	396	—
0,750 mM Zinksulfat	445	1860
Ohne Zusatz (Kontrolle)	98	790

Tabelle 4: Förderung der Nourseothricin-Bildung in Fermenterkulturen des Stammes *Streptomyces noursei* IMET JA 3890b durch Zusatz von Zinksulfat; Medium Bo-32

Konzentration des Zusatzes	$\mu\text{g/ml}$ Nourseothricin						
	Kulturdauer:	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
0,048 % Zinksulfat		56	210	990	2377	4876	5020
Ohne Zusatz (Kontrolle)		65	200	530	760	865	850