

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 01284

(54) Procédé microbiologique de production de narasine et cultures contenant le microorganisme producteur *Streptomyces lydicus* DeBoer et al.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 P 17/06; C 12 N 1/04
// A 61 K 31/35; C 12 R 1/465.

(22) Date de dépôt..... 23 janvier 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : EUA, 28 janvier 1980, n° 115,656.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 34 du 21-8-1981.

(71) Déposant : ELI LILLY AND CO., société constituée sous les lois de l'État de l'Indiana, résidant aux EUA.

(72) Invention de : Ralph Emil Kastner et Robert L. Hamill.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Langner-Parry,
7, rue de la Paix, 75002 Paris.

Cette invention concerne un nouveau procédé microbiologique de préparation de l'antibiotique dit narasine.

La narasine est un antibiotique de type polyéther connu, actif contre les bactéries gram-positives les bactéries
5 anaérobies, les champignons et utilisable comme agent anti-coccidien et comme agent permettant d'augmenter l'utilisation des aliments chez les ruminants. Sa préparation par fermentation de Streptomyces aureofaciens NRRL 5758 ou
10 Streptomyces aureofaciens NRRL 8092 a préalablement été décrite dans le brevet des E.U.A. N° 4.038.384, voir également Berg et al. dans Journal of Antibiotics, 31, 1-6 (1978).

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation de l'antibiotique dit narasine par culture d'une nouvelle souche récemment découverte, appelée ici
15 Streptomyces lydicus DeBoer et al., NRRL 12034, ou un de ses mutants ou variants producteurs de narasine, dans un milieu de culture contenant des sources assimilables de carbone, d'azote et de sels minéraux dans des conditions de fermentation aérobie en immersion jusqu'à production d'une quantité substantielle
20 de narasine par ledit organisme dans ledit milieu de culture, et, éventuellement, isolement de ladite narasine à partir du milieu de culture.

L'invention concerne en outre le nouveau micro-organisme Streptomyces lydicus DeBoer et al, NRRL 12034, et
25 des milieux de culture contenant ce micro-organisme sous forme biologiquement pure.

Le nouveau micro-organisme de cette invention utilisable pour la production de l'antibiotique dit narasine est une culture biologiquement pure obtenue à partir d'un
30 échantillon de sol recueilli près du fleuve Surinam, au Surinam, et le numéro A-39861.3 a été attribué à la culture dans un but d'identification.

La culture A-39861.3 est classée comme une souche de Streptomyces lydicus DeBoer et al., en se basant sur une culture
35 simultanée de Streptomyces hygroscopicus, Streptomyces endus, Streptomyces platensis et Streptomyces lydicus en utilisant les procédés et les milieux recommandés par Shirling et Gottlieb ["Methods of Characterization of Streptomyces

species," Intern. Bull. of Systematic Bacteriol. 16, 313-340 (1966)], ainsi que certains essais supplémentaires. D'après les caractéristiques obtenues, Streptomyces lydicus a été choisi comme étant l'espèce la plus apparentée. Les principales
 5 différences entre la culture A-39861.3 et la culture type de S. lydicus se trouvent dans le diagramme d'utilisation du carbone, un niveau plus élevé de tolérance à NaCl que présente S. lydicus, et la production d'un mycélium aérien blanc par la culture A-39861.3 sur plusieurs milieux.

10 Les noms des couleurs ont été attribués selon la méthode ISCC-NBS (K.L. Kelly et D.B. Judd, "The ISCC-NBS Methods of Designating Colors and a Dictionary of Color Names" U.S. Department of Commerce Circ. 553, 1955, Washington, D.C.). Les chiffres entre parenthèses se réfèrent à la série de
 15 couleurs de Tresner et Backus [H.D. Tresner and E.J. Backus, "System of Color Wheels for Streptomycete Taxonomy, "Appl. Microbiol. 11, 335-338 (1956)]. Les désignations tab des couleurs sont soulignées. Les indications de couleur selon Maerz et Paul (A. Maerz and M.R. Paul, "Dictionary of Color"
 20 McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, N.Y., (1950) sont indiquées entre crochets.

Les sucres des parois cellulaires ont été déterminés en utilisant une modification du mode opératoire de M.P. Lechavalier ["Chemical Methods as Criteria for the
 25 Separation of Actinomycetes Into Genera". Travail financé par le Subcommittee on Actinomycetes of the American Society of Microbiology. (Dr. Thomas G. Pridham, Convenor.) et effectué à l'Institute of Microbiology, Rutgers University, The State University of New Jersey, New Brunswick, N.J.,
 30 (1971)]. Les isomères de l'acide diaminopimélique ont été déterminés en utilisant le procédé de Becker et al., Appl. Microbiol. 11, 421-423 (1964). Toutes les plaques sont lues après 13 jours à 30°C, à moins d'indication contraire.

CARACTERISATION DE LA SOUCHE PRODUCTRICE DE NARASINE

35 Morphologie

Un examen au microscope électronique montre que les spores sont lisses. Les sporophores sont spiralés, les spirales étant ouvertes et pas très serrées. Des spirales de

deux à trois tours sont courantes. On observe parfois une boucle ou un crochet. Les spores sont ovales à légèrement cylindriques et mesurent en moyenne $1,365 \mu\text{m} \times 1,69 \mu\text{m}$, avec un intervalle de $1,3 \mu\text{m}$ à $1,95 \mu\text{m} \times 1,3 \mu\text{m}$ à $2,6 \mu\text{m}$.

5

TABLEAU 1Caractéristiques de culture sur divers milieux

<u>Milieu</u>	<u>Caractéristiques</u>
10 Gélose de farine d'avoine et de pâte de tomate	Croissance abondante, envers du milieu jaune-brun [14F6] à noir [8C8] vers le centre de l'inoculum. Mycélium aérien abondant. Gris (GY) <u>3fe</u> gris-brunâtre clair à <u>4ig</u> brun-grisâtre clair. Pas de pigment soluble. Hygroscopique.
Gélose d'extrait de levure et d'extrait de malt (milieu ISP N° 2)	Culture abondante, envers brun clair [13F8]. Bon mycélium aérien. Blanc (W) <u>b</u> blanc ; pas de pigment soluble.
15 Gélose de farine d'avoine (Milieu ISP N° 3)	Culture abondante, envers olive grisâtre clair [13H4]. Mycélium aérien abondant (GY) <u>3fe</u> gris brunâtre clair. Pigment soluble verdâtre. Zones hygroscopiques noires près de la bordure de l'inoculum.
20 Gélose d'amidon et de sels minéraux (milieu ISP N° 4)	Culture abondante, envers dans la culture plus jeune de brun à brun-jaune (7 jours) devenant gris foncé [8A9] à noir [8A8] en 14 jours. Bon mycélium aérien (GY) <u>d</u> gris clair. Hygroscopique.
25 Gélose de glycérol et d'asparagine (milieu ISP N° 5)	Croissance abondante, envers brun jaune moyen [14J7]. Bon mycélium aérien et spores (W) <u>b</u> blanc. Pigment soluble brun léger.
Gélose d'Emerson	Croissance abondante, envers brun-jaune fort [13I8]. Mycélium aérien abondant et spores (W) <u>b</u> blanc. Pas de pigment soluble.
30 Gélose modifiée de Bennett	Bonne croissance, envers orange-brunâtre [12B9] ; mycélium aérien rare ou absent ; quand il est présent (GY) <u>2dc</u> gris-jaunâtre. Pas de pigment soluble.
35 Gélose de solution de Czapek	Croissance très médiocre, pas de mycélium aérien ni de spores. Pas d'attribution de couleur.
Gélose nutritive	Bonne croissance, envers jaune pâle [11C2]. Ni mycélium aérien ni spores ; pas de pigment soluble.

Gélose de malate de calcium	Bonne croissance, envers olive grisâtre clair [14B2] ; pas de mycélium aérien ni de spores. Pigment soluble brun léger.
5 Gélose de glycérol et de glycine	Bonne croissance, envers olive moyen [15L6]. Bon mycélium aérien et spores (GY) <u>2dc</u> gris-jaunâtre. Pas de pigment soluble.
Gélose d'extrait de levure et de tryptone	Croissance médiocre, ni mycélium aérien ni spores. Pas d'attribution de couleur.
10 Gélose de tyrosine	Bonne croissance, envers brun-jaunâtre clair [13H7]. Bon mycélium aérien et spores (Y) <u>2db</u> à <u>2fb</u> jaune pâle. Pigment soluble brun léger.
Gélose de glucose et d'asparagine	Bonne croissance, envers brun jaunâtre clair [13H7]. Bon mycélium aérien et spores (GY) <u>2dc</u> jaune-grisâtre. Pas de pigment soluble.
15	

On étudie des propriétés physiologiques sélectionnées de l'organisme selon des modes opératoires classiques. Les propriétés observées et les caractéristiques trouvées sont données dans le Tableau II :

TABLEAU II

PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES DE A-39861.3

Production de pigments de type mélanoidé sur :

1. Cultures inclinées de fer-extrait de levure-peptone
2. Cultures inclinées sur gélose de tyrosine
3. Bouillon d'extrait de levure et de tryptone

Pas de pigment de type mélanoidé
 Pas de pigment de type mélanoidé
 Pas de pigment de type mélanoidé

Réduction des nitrates

Liquéfaction de la gélatine

Morceaux de pomme de terre

Morceaux de carotte

Hydrolyse de l'amidon

Lait écrémé

Positive

La gélatine est liquéfiée à 60 %
 en 14 jours

Bonne croissance végétative
 jaune-brun ; pas de mycélium
 aérien ; la couleur du morceau
 de pomme de terre n'est pas
 changée.

Pas de croissance
 Amidon hydrolysé
 Lait peptonisé

2476128

TABEAU II (suite)

Exigences en température

On utilise des cultures inclinées sur gélose de milieu ISP N° 2, et gélose d'extrait de levure et d'extrait de malt
On fait incuber les cultures inclinées à 20°, 25°, 30°, 37°, 43° et 49°C.

Tolérance à NaCl

On utilise de la gélose de milieu ISP N° 2, de la gélose d'extrait de levure et d'extrait de malt.
On ajoute NaCl à des taux de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 8 %, 10 % et 12 %. Une gélose de milieu ISP N° 2 sans NaCl ajouté sert de témoin.

Le micro-organisme tolère des niveaux de 1 % à 3 %. A des taux supérieurs à 3 %, on n'observe pas de croissance.

Réaction à des changements du pH

On utilise une gélose de milieu ISP N° 2 et une gélose d'extrait de levure et d'extrait de malt.
On ajuste le pH de la gélose à des taux de 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 10,0 et 11,5 après passage à l'autoclave pour la stérilisation.

Croissance et sporulation abondantes de pH 5,0 à pH 8,0. A pH 10,0, la culture se fait sous forme de colonies isolées avec un mycélium aérien rare. A pH 11,5, pas de croissance.

476128

On détermine l'utilisation du carbone en utilisant le milieu de base de Pridham et Gottlieb auquel on ajoute les sources de carbone jusqu'à une concentration finale de 1,0 %, selon la description de Shirling and Gottlieb, supra.

5 Les sources de carbone sont stérilisées avant d'être ajoutées au milieu de base. On lit les plaques après cinq, neuf et seize jours d'incubation à 30°C, les lectures finales étant seules indiquées.

Les résultats des essais d'utilisation du carbone
10 effectués avec la culture A-39861.3 sont indiqués dans le Tableau III.

TABLEAU III
UTILISATION DU CARBONE

5	Substrat : Sources de carbone ajoutées au milieu de base de <u>Pridham et Gottlieb</u>	Réaction de A-39861.3 au bout de 16 jours
	D-Glucose *	++
	D-Xylose **	+
	L-Arabinose *	++
10	L-Rhamnose *	++
	D-Fructose *	++
	D-Galactose	++
	Raffinose *	-
	D-Mannitol *	-
15	i-Inositol *	+
	Salicine	+
	Saccharose *	±
	Cellobiose	++
	D-Maltose	++
20	Mélibiose	-
	Mélézitose	±
	Amidon soluble	++
	Tréhalose	++
	Turanose	±
25	* Sources de carbone du International <u>Streptomyces</u> Project (Shirling et Gottlieb, <u>supra.</u>)	
	Résultats : ++ = utilisation positive forte	
	+ = utilisation positive	
	± = utilisation douteuse	
30	- = utilisation négative	

Etudes des parois cellulaires

En utilisant des parois entières hydrolysées de l'organisme, on détermine la présence de certains sucres importants pour des raisons de diagnostic. On utilise les parois cellulaires isolées pour déterminer les isomères de l'acide diaminopimélique. Les résultats de ces études sur parois cellulaires sont indiqués ci-dessous.

<u>Essai</u>	<u>Résultat observé</u>
Isomères de l'acide diaminopimélique	isomère LL
Sucres de diagnostic détectés	glucose, ribose

5

Une comparaison du diagramme d'utilisation du carbone de la souche A-39861.3 et de Streptomyces lydicus est donnée dans le Tableau IV suivant.

TABLEAU IV
Schéma d'utilisation du carbone par A-39861.3 et Streptomyces lydicus

<u>Source de carbone</u>	<u>A-39861.3</u>	<u>S. lydicus</u>
D-Glucose	++	++
L-Arabinose	++	++
D-Xylose	++	+
i-Inositol	++	++
D-Mannitol	-	++
L-Rhamnose	++	-
Raffinose	-	++
D-Mannitol	-	++
Salicine	+	+

TABLEAU IV (suite)

<u>Source de carbone</u>		<u>A-39861.3</u>	<u>S. lydicus</u>
Saccharose		+	++
Cellobiose		++	+
D-Maltose		++	++
Mélézitose		+	++
Amidon soluble		++	++
Trehalose		++	++
++ = utilisation positive forte			
+ = utilisation positive			
+ = utilisation douteuse			
- = utilisation négative			

Les similitudes et les différences entre A-39861.3 et Streptomyces lydicus sont données dans le Tableau V.

TABLEAU V
SIMILITUDES ET DIFFERENCES ENTRE
A-39861.3 et S. lydicus

<u>Essai, caractéristique, etc.</u>	<u>A-39861.3</u>	<u>S. lydicus</u>
Morphologie des sporophores	Spiralés	Spiralés
Ornementation des spores	lisse	lisse
Pigment de type mélanoïde	négatif	négatif
::Mycélium aérien	principalement gris-blanc sur certains milieux	gris
Liquéfaction de la gélatine	+	+
::Lait écrémé	peptonisé	hydrolysé
::Réduction des nitrates	+	-
::Tolérance à NaCl	3 %	8 %
Isomère de l'acide diaminopimélique	isomère LL	isomère LL
::Dénote des différences		

Les propriétés morphologiques et physiologiques de ces deux souches sont en bon accord, sauf pour les différences de réduction des nitrates indiquées dans le Tableau V.

Les autres espèces apparentées diffèrent de la culture

5 A-39861.3 comme suit :

1. Streptomyces hygroscopicus et Streptomyces endus produisent des spores grumeleuses alors que l'ornementation des spores de la culture A-39861.3 est lisse.
- 10 2. Streptomyces platensis diffère de A-39861.3 par la production d'un mycélium végétatif brun orange à brun rouge sur certains milieux. En outre, Streptomyces hygroscopicus, Streptomyces endus et Streptomyces platensis sont
- 15 extrêmement hygrosopiques alors que le caractère hygrosopique de Streptomyces lydicus n'est pas aussi prononcé.

L'organisme Streptomyces lydicus DeBoer et al., producteur de narasine a été déposé et fait partie de la
20 collection de culture de Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois, 61604 où il est disponible au public sous le numéro NRRL 12034. (Dépôt du 17 Septembre 1979.).

Comme c'est le cas avec d'autres organismes, les
25 caractéristiques de la culture productrice de narasine de Streptomyces lydicus DeBoer et al NRRL 12034, sont sujettes à variation. Par exemple, des mutants (spontanés ou induits), des transconjuguants et des recombinants (comprenant de l'ADN recombinant sur des plasmides) de la souche NRRL 12034,
30 ou dérivés de cette souche, qui produisent l'antibiotique narasine, peuvent être utilisés dans cette invention.

Un certain nombre de milieux différents peuvent être utilisés pour produire la narasine avec Streptomyces lydicus DeBoer et al NRRL 12034. Ces milieux doivent contenir
35 des sources assimilables de carbone, d'azote et de sels minéraux. Les sources de carbone appropriées comprennent le glucose, l'amidon et la dextrine. Des sources d'azote appropriées comprennent la peptone, la caséine hydrolysée par

une enzyme, la farine de graine de coton et la peptone de viande.

Les oligo-éléments nécessaires à la croissance et au développement de l'organisme peuvent se trouver comme

5 impuretés dans d'autres constituants des milieux, en quantités suffisantes pour satisfaire les besoins de croissance et les besoins biosynthétiques de l'organisme. Cependant, il peut être intéressant d'incorporer dans le milieu de culture d'autres sels minéraux nutritifs solubles pouvant fournir les
10 ions sodium, potassium, magnésium, calcium, ammonium, chlorure, carbonate, phosphate, sulfate, nitrate, etc.

Il peut être nécessaire d'ajouter de petites quantités (c'est-à-dire 0,2 ml/litre) d'un agent antimoissant comme du propylèneglycol dans les milieux de fermentation à
15 grande échelle si la formation de mousse pose des problèmes.

Pour la production de quantités substantielles de narasine en utilisant NRRL 12034, on utilise la fermentation aérobie en immersion dans des réservoirs. On peut cependant obtenir de petites quantités de narasine par culture sur
20 flacon agité. Pour la fermentation en réservoir, il est préférable d'utiliser un inoculum végétatif. On prépare l'inoculum végétatif en inoculant un petit volume de milieu de culture par la forme spore, des fragments mycéliens ou une pastille lyophilisée de l'organisme pour obtenir une culture
25 fraîche en croissance active de l'organisme. On transfère ensuite l'inoculum végétatif dans un réservoir plus grand où après un temps d'incubation approprié la narasine antibiotique est obtenue avec un rendement optimal.

Le pH du milieu de fermentation non inoculé varie
30 avec le milieu utilisé pour la production, mais le pH de tous les milieux de fermentation est compris entre environ 6,5 et environ 7,5.

L'organisme producteur de narasine peut être cultivé sur un large intervalle de température d'environ 25 à environ
35 37°C. Il semble que la production optimale de narasine avec NRRL 12034 se produise à une température d'environ 30°C.

Comme il est courant dans les procédés de culture en immersion aérobie, de l'air stérile est dispersé dans le

milieu de culture. Pour une croissance efficace de l'organisme, le volume d'air utilisé dans la production en réservoir est compris entre environ 0,25 et environ 1,0 volume d'air par volume de milieu de culture par minute 5 (v/v/mn). Un débit optimal dans un récipient de 10 litres est d'environ 0,5 v/v/mn, l'agitation étant fournie par des appareils d'agitation classiques tournant à environ 600 tours par minute.

La production de la narasine peut être contrôlée 10 pendant la fermentation soit par diffusion sur gélose soit par des procédés turbidimétriques. Les organismes d'essai que l'on peut utiliser comprennent Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis et Micrococcus luteus.

Une activité antibiotique est généralement présente 15 après environ 40 heures et reste présente pendant au moins deux jours ou plus pendant la période de fermentation. La production antibiotique maximale se produit à un temps de fermentation d'environ deux à environ quatre jours.

La narasine peut être recueillie du milieu de 20 fermentation par des procédés connus dans le domaine et décrits dans le brevet des E.U.A. N° 4.038.384.

Le nouvel organisme producteur de narasine Streptomyces lydicus DeBoer et al NRRL 12034, produit de bonnes quantités du facteur A de la narasine ainsi que de 25 faibles quantités du facteur D de la narasine. Les composés peuvent être obtenus, si on le désire, comme antibiotiques séparés par purification plus poussée du complexe, par exemple par des techniques de chromatographie sur colonne. Elles sont décrites dans le brevet des E.U.A. N° 4.038.384 30 dont la description est incorporée ici par voie de référence et fait partie de la présente demande de brevet.

Pour illustrer plus complètement le fonctionnement de l'invention, en utilisant divers milieux de fermentation, on donne les exemples suivants. Cependant, le domaine de 35 l'invention n'est pas limité par les exemples.

EXEMPLE 1

On prépare un milieu que l'on utilise pour la culture sur gélose inclinée de Streptomyces lydicus DeBoer et al NRRL 12034 :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/l)</u>
	Dextrine de pomme de terre	10,0
	Caséine hydrolysée par une enzyme ¹	2,0
	Extrait de boeuf	1,0
5	Extrait de levure	1,0
	Gélose	2,0
	Solution minérale de Czapek	2,0 ml/l
	Eau désionisée	q.s.p. 1 litre
10	¹ N-Z-Amine A (Humko Sheffield Chemical Co., Memphis, Tennessee, U.S.A.)	

On prépare la solution minérale de Czapek à partir des ingrédients suivants :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/100 ml)</u>
15	KCl	10,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	10,0
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2
	Eau désionisée	q.s.p. 100 ml

On inocule des spores de Streptomyces lydicus DeBoer et al NRRL 12034 sur une gélose inclinée nutritive préparée à partir des ingrédients précédents et l'on fait incuber la culture ainsi inoculée pendant environ sept jours à une température d'environ 30°C. Puis on recouvre la culture mûre d'eau et on la gratte avec un instrument stérile pour libérer les spores et le mycélium. On utilise 1 ml de la suspension de spore résultante pour inoculer 50 ml d'un milieu végétatif ayant la composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/l)</u>
	Dextrose	15,0
30	Farine de soja	15,0
	Liqueur de macération de maïs	5,0
	CaCO ₃	2,0
	NaCl	5,0
	Solution minérale de Czapek	2,0 ml/l
35	Eau désionisée	q.s.p. 1,0 l

On fait incuber l'inoculum végétatif dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml à large embouchure à environ 30°C pendant environ 48 heures sur un agitateur tournant d'un arc de 5 cm

de diamètre à 250 tours par minute. On utilise ce milieu incubé pour inoculer de petits appareils de fermentation (l'inoculum représentant environ 1 % du volume du milieu) ou pour inoculer des flacons de second stade pour la production d'un plus grand volume de mycélium.

On place des parties aliquotes de 200 ml du milieu de production dans des flacons Erlenmeyer de 1,0 litre et on les stérilise à 121°C pendant environ 30 minutes. Après refroidissement, on inocule les flacons avec un inoculum à 5 % de l'inoculum végétatif. On fait incuber la culture sur un agitateur alternatif à 108 coups par minute avec une course de 5 cm. Le pH du milieu de fermentation au bout de 72 heures est environ 8,0. On effectue la fermentation à 30°C.

EXEMPLE 2

On produit de la narasine en utilisant un milieu de production stérile ayant la composition suivante :

<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/l)</u>
Agent antimoussant siliconé ¹	0,2
Glucose	10,0
Mélasse	20,0
Peptone	5,0
CaCO ₃	2,0
Eau désionisée	q.s.p. 9,0 litre

¹Dow-Corning Antifoam A

On inocule ce milieu de production ayant un pH de 6,7 avec 2,0 % d'inoculum provenant du milieu de second stade obtenu comme décrit dans l'Exemple 1. On laisse le milieu de production inoculé fermenter dans un réservoir de fermentation de 10 litres pendant environ trois jours à une température d'environ 30°C. On aère le milieu de fermentation avec de l'air stérile à un taux de 0,5 v/v/mn et on l'agite avec des agitateurs classiques à environ 400 tours par minute.

EXEMPLE 3

On produit de la narasine selon le mode opératoire de l'Exemple 2 mais en utilisant un milieu de production stérile ayant la composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/l)</u>
	Agent antimoissant siliconé ¹	0,2
	Glucose	25,0
	Amidon de maïs	10,0
5	Peptone de viande liquide	10,0
	Caséine hydrolysée par une enzyme ²	4,0
	Mélasse noire	5,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	CaCO ₃	2,0
10	Solution minérale de Czapek	2,0 ml
	Eau désionisée	q.s.p. 9 litres

¹Dow-Corning Antifoam A

²N-Z-Amine A (Humko Sheffield Chemical Co., Memphis,
15 Tennessee, U.S.A.)

On inocule ce milieu de production ayant un pH de 6,5 avec 2,0 % d'inoculum et on laisse fermenter dans un réservoir de fermentation de 10 litres pendant environ 4 jours à une température d'environ 30°C. On aère le milieu de
20 fermentation avec de l'air stérile à raison de 0,5 v/v/mn et on l'agite avec un agitateur classique à environ 600 tours par minute.

EXEMPLE 4

On produit de la narasine selon le mode opératoire
25 de l'Exemple 2 mais en utilisant un milieu de production stérile ayant la composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/l)</u>
	Agent antimoissant siliconé ¹	0,2
	Dextrine de tapioca	30,0
30	Caséine hydrolysée par une enzyme ²	10,0
	Solution minérale de Czapek	2,0 ml
	Eau désionisée	q.s.p. 9 litres

¹Dow-Corning Antifoam A

²N-Z-Amine A (Humko Sheffield Chemical Co., Memphis,
35 Tennessee, U.S.A.)

On ajuste le pH du milieu de production, qui est initialement de 6,4, à 7,1 avec environ 3 ml d'hydroxyde de

potassium aqueux 10 N avant stérilisation, puis on l'inocule avec 2 % d'inoculum. On laisse le milieu fermenter dans un réservoir de fermentation de 10 l pendant environ 3 jours à une température d'environ 30°C. On aère le milieu de fermentation avec de l'air stérile à un taux de 0,5 v/v/mn et on l'agite avec un agitateur classique à environ 600 tours par minute.

EXEMPLE 5

Isolement et purification

10 On filtre dix litres de bouillon de fermentation en utilisant un adjuvant de filtration (adjuvant de filtration Hyflo Supercel, terre de diatomées produite par Johns-Manville Corp.) et on lave le gâteau de filtration avec de l'eau. On combine le filtrat de bouillon avec l'eau de lavage et on
15 extrait deux fois avec des portions de 4,5 litres d'acétate d'éthyle. On réunit les extraits d'acétate d'éthyle et on les concentre sous vide pour obtenir un résidu huileux. On dissout le résidu dans 100 ml d'acétone et on ajoute 100 ml d'eau. On ajuste le pH de la solution à 3,0 avec de l'acide
20 chlorhydrique aqueux 1 N et on agite la solution pendant environ une heure à la température ambiante. On filtre les cristaux qui se forment et on les lave avec de l'eau froide. On recristallise les cristaux en les dissolvant dans 50 ml d'acétone, en ajoutant 50 ml d'eau et en laissant le mélange
25 reposer pendant une nuit à la température ambiante. On filtre les cristaux qui se forment, on les lave avec de l'eau froide et on les sèche sous vide et l'on obtient 100 mg de cristaux blancs. On montre que les cristaux sont identiques à la narasine par RMN, IR, UV et spectre de masse et par
30 chromatographie sur couche mince combinée à un bioautographe.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production de la narasine antibiotique, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver Streptomyces lydicus DeBoer et al NRRL 12034 ou un de ses mutants ou variants producteurs de narasine, dans un milieu de culture
5 contenant des sources assimilables de carbone, d'azote et de sels minéraux dans des conditions de fermentation aérobies en immersion jusqu'à production d'une quantité substantielle d'activité antibiotique par ledit organisme dans ledit milieu de culture.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'organisme est Streptomyces lydicus DeBoer et al NRRL 12034.
3. Procédé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape supplémentaire
15 de séparation de la narasine du milieu de culture.
4. Narasine quand elle est préparée par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 3.
5. Milieu de culture contenant Streptomyces lydicus DeBoer et al NRRL 12034, sous forme biologiquement pure et
20 des sources assimilables de carbone, d'azote et de sels minéraux.