



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

① CH 650 528 A5

⑤ Int. Cl. 4: C 12 N 9/06

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

⑲ Numero della domanda: 6051/81

⑶ Titolare/Titolari:
ENI - Ente Nazionale Idrocarburi, Roma (IT)

⑳ Data di deposito: 18.09.1981

⑳ Priorità: 19.09.1980 IT 24757/80

⑺ Inventore/Inventori:
Olivieri, Roberto, Mentana (IT)
Fascetti, Eugenio, Roma (IT)
Ciuffolotti, Pierluigi, Roma (IT)
Degen, Ludwig, Roma (IT)

㉔ Brevetto rilasciato il: 31.07.1985

④ Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 31.07.1985

④ Mandatario:
Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤ **Procedimento per la produzione di uricasi.**

⑥ E stato trovato che uricasi altamente attiva può essere prodotta per fermentazione dal microorganismo batterico *Micrococcus roseus* NRRL B 12196. L'optimum di attività di questo microorganismo è vicino ai valori di pH dei liquidi fisiologici.

L'uricasi prodotta è utilizzabile in diagnostica clinica per determinazioni dell'acido urico.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di uricasi consistente nel coltivare il microorganismo *Micrococcus roseus* NRRL B-12196 in condizioni aerobiche in presenza di un terreno di coltura contenente una fonte di carbonio assimilabile, una fonte di azoto, una fonte di fosforo e sali minerali.

2. Procedimento per la produzione di uricasi secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la temperatura della coltura è compresa tra 10 e 40°C.

3. Procedimento per la produzione di uricasi secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che la temperatura della coltura è preferibilmente compresa tra 25 e 35°C.

4. Procedimento per la produzione di uricasi secondo le rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che il pH del mezzo di coltura è compreso tra 6 e 9.

5. Procedimento per la produzione di uricasi secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che il pH del mezzo di coltura è preferibilmente compreso tra 7 e 8.

La presente invenzione si riferisce ad un procedimento per la produzione dell'enzima uricasi (EC 1.7.3.3.) altamente attivo, e utilizzabile in diagnostica clinica per la determinazione di acido urico nel siero o nelle urine.

L'uricasi è un enzima che catalizza l'ossidazione dell'acido urico ad allantoina e non è presente nei tessuti dei mammiferi superiori tra cui l'uomo; è invece presente nei tessuti, specialmente degli organi interni, di mammiferi inferiori e in quantità più o meno elevata in alcuni microorganismi. È stato ora trovato, e ciò costituisce un primo oggetto della presente invenzione, che l'uricasi può essere prodotta dal *Micrococcus roseus*, microorganismo fino ad ora non noto come produttore di detto enzima e che inoltre possiede, rispetto agli altri microorganismi noti, il vantaggio di produrre elevate quantità di uricasi in terreni contenenti basse concentrazioni di acido urico. È stato inoltre sorprendentemente osservato che l'optimum di attività dell'uricasi prodotta dal *M. roseus* NRRL B 12196 è, a differenza della uricasi prodotta da altri batteri, vicino ai valori di pH dei liquidi fisiologici; ciò rappresenta un vantaggio in quanto non è necessario modificare il pH del campione biologico in cui si vuole determinare l'acido urico, eliminando così possibili rischi di alterazione chimica del campione in esame. Questo microorganismo è stato isolato da terreno agrario nei pressi di Monterotondo (Roma) e possiede le seguenti caratteristiche morfologiche e biochimiche.

Morfologia microscopica

Sfere di 1-1,25 µm di diametro, immobili e Gram positive, formano, dividendosi su più di un piano, dei pacchetti cubici o raggruppamenti irregolari; talvolta appaiono a coppie oppure isolate.

Morfologia macroscopica

— Colonie su agar nutriente: sollevate, margine intiero, color rosa, superficie liscia, 1-2 mm di diametro
— slant di agar nutriente: patina di color rosa pallido, liscia, lucida.

Caratteristiche biochimiche

— Crescita in glucose broth: leggera torbidità con deposito mucoide lievemente roseo, pH = 6,5
— Cresce a 10°C, non a 45°C, ottimo tra 25 e 35°C.
— Cresce con glucose broth contenente NaCl al 5 e al 10%, non al 15%
— Non cresce in Simmons citrate agar
— Produzione aerobica di acidità da zuccheri in Purple broth base (DIFCO): xilosio, glicerolo, mannitolo, lattosio,

maltosio, sorbosio, ribosio, arabinosio, raffiniosio, cellobosio, negativi; glucosio, saccarosio, fruttosio leggera acidificazione ritardata (7-10 giorni).

- Idrolisi arginina negativa
- 5 — Idrolisi amido positiva
- Idrolisi gelatina negativa
- Ureasi positiva
- H₂S: negativo
- catalisi: positiva
- 10 — nitratasi: positiva
- indolo: negativo
- acetoina: negativa
- Rosso metile: negativo
- lecitinasi: negativo
- 15 — lipasi (burro e olio d'oliva): negativo.

Confrontando queste caratteristiche con le descrizioni del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology VIII Ed. il microorganismo secondo la presente invenzione appartiene alla famiglia delle Micrococcaceae, genere *Micrococcus*, specie *roseus*. Esso è stato depositato il 20.6.1980 presso il «Northern Regional Research Center» di Peoria (Illinois, USA) dove ha assunto la sigla NRRL B-12196.

La coltivazione del *Micrococcus roseus* NRRL B-12196 può essere eseguita in condizioni aerobiche con qualsiasi metodo noto: p. es. in colture di superficie, o, preferibilmente, in coltura sommersa usando fermentatori agitati. Il terreno di coltura, che può essere solido o liquido, contiene una fonte di carbonio assimilabile, una fonte di azoto, di fosforo, nonché sali minerali e vitamine.

30 Le colture possono essere ottenute a temperature comprese tra i 10°C e i 40°C preferibilmente tra 25 e 35°C in un tempo tra 10 e 48 ore, preferibilmente tra 20 e 30 ore ad un pH tra 6 e 9, preferibilmente 7 ÷ 8.

Come fonti di carbonio possono essere utilizzati ad esempio: glucosio, lattato, acetato, saccarosio, fumarato, acido urico, corn steep liquor, glicerina.

35 Come fonti di azoto possono essere utilizzati ad esempio: idrolizzati di carne, di caseina, o soia, sali ammoniacali, urea, nitrati, acido urico.

40 L'estrazione, ed eventualmente la purificazione, della uricasi dalla pasta batterica viene effettuata con i comuni metodi usati in enzimologia. L'uricasi estratta da *Micrococcus roseus* NRRL B-12196 può essere vantaggiosamente immobilizzata in matrice polimeriche mediante formazione di legami chimici con la matrice, oppure legami di tipo ionico, oppure mediante semplice immobilizzazione fisica. Gli esempi che seguono evidenziano altre modalità operative concernenti la presente invenzione, ma non solo limitanti di essa.

50

Esempio 1

Si prepara un brodo di coltura avente la seguente composizione:

estratto di lievito 15 g/l
55 acido urico 2 gl

Il pH veniva aggiustato a 7,2 con NaOH ed il terreno distribuito in porzioni da 200 ml in beute da 500 ml. Dopo sterilizzazione a 116°C per 30', le beute venivano inoculate con una coltura del ceppo NRRL B-12196 la slant contenente lo stesso terreno con il 2% di agar e incubate per 24 ore a 30°C sotto agitazione orbitale (220 rpm). Le cellule venivano quindi raccolte per centrifugazione; da 200 ml di brodo si ottenevano 3 g di pasta (peso umido). La pasta cellulare così ottenuta veniva sospesa in 60 ml di tampone 65 fosfato 0,1 M pH = 8,5 e passata alla French Pressure Cell Press, fino a completa rottura delle cellule. Nell'estratto così ottenuto veniva determinata l'attività enzimatica: 1 g di cellule umide conteneva 100 unità uricasiche.

Dosaggio dell'uricasi.

L'attività uricasica veniva determinata per via spettrofotometrica seguendo la scomparsa di acido urico a 283 nm secondo il metodo descritto da Mahler et al. (J. Biol. Chem. 1955, 216, 625) modificato come di seguito riportato: 7 ml di una soluzione contenente 20 mg di acido urico in 100 ml di tampone fosfato 0,1 M pH 8,5 venivano messi in una beutina da 50 ml e posti a incubare a 30°C in un bagno ad acqua agitato. La reazione aveva inizio con l'aggiunta di una appropriata quantità di estratto enzimatico. Subito dopo l'aggiunta dell'estratto così come dopo 10' di reazione venivano prelevati 0,5 ml di miscela di reazione e addizionati a 4 ml di HCl 0,1 M. L'assorbanza delle soluzioni così ottenute veniva letta a 283 nm. Viene definita unità uricasica la quantità di enzima capace di degradare 1 µmole di acido urico per minuto nelle condizioni del saggio sopradescritte.

Esempio 2

Veniva preparato un estratto di cellule di *M. roseus* NRRL B-12196 come descritto nell'esempio 1.

L'estratto grezzo veniva centrifugato e sul sovrantante

veniva determinata l'attività uricasica come sopra descritto, utilizzando acido urico disciolto in soluzioni di fosfati a 0,1 M a diversi pH, come miscela di reazione. Venivano anche determinate in parallelo le attività di estratti enzimatici ottenuti da colture di *Bacillus fastidiosus* nelle stesse condizioni sperimentali adottate per il *M. roseus*. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 1 dove sono state riportate uguali a 100 le attività a pH 9 degli estratti dei due microorganismi.

TABELLA 1

Attività uricasiche relative in funzione del pH in estratti di *B. fastidiosus* e *M. Roseus*

15 pH miscela di reazione	Estratto di <i>M. Roseus</i>	Estratto di <i>B. fastidiosus</i>
6,5	71	13,5
7,0	94	35
7,5	103	57
20 8,0	106	85
8,5	103	95
9,0	100	100