

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 576 909

②1 N° d'enregistrement national : **86 01498**

⑤1 Int Cl⁴ : C 12 N 9/06 // (C 12 N 9/06, C 12 R 1:10).

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 4 février 1986.

③0 Priorité : JP, 5 février 1985, n° 20625/1985.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 32 du 8 août 1986.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *TOYO JOZO CO., LTD. (société de droit
japonais).* — JP.

⑦2 Inventeur(s) : Eiichi Yoshino, Shigeyuki Imamura, Kazuo
Matsuura et Hideo Misaki.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Malémont.

⑤4 Bilirubine oxydase thermostable et son procédé d'obtention.

⑤7 Bilirubine oxydase thermostable présentant une spécificité
de substrat vis-à-vis d'au moins la bilirubine et capable de
catalyser une réaction dans laquelle de la biliverdine et de l'eau
sont formées à partir de bilirubine d'oxygène. On peut obtenir
cette bilirubine oxydase en cultivant un micro-organisme pro-
ducteur de bilirubine oxydase appartenant à l'espèce *Bacillus*,
par exemple *Bacillus licheniformis*, et ensuite en préparant la
bilirubine résultante à partir du bouillon cultivé.

FR 2 576 909 - A1

D

2576909

BILIRUBINE OXYDASE THERMOSTABLE ET SON PROCEDE D'OBTENTION

La présente invention se rapporte à une nouvelle bilirubine oxydase et à son procédé d'obtention. Plus particulièrement, la présente invention se rapporte à une nouvelle bilirubine oxydase thermostable et à un procédé pour l'obtention de bilirubine oxydase qui consiste à cultiver un micro-organisme producteur de bilirubine oxydase, appartenant à l'espèce Bacillus et, ensuite, à préparer la bilirubine oxydase résultante à partir du bouillon cultivé.

La bilirubine oxydase a été connue, d'une façon classique, comme une enzyme qui présente une spécificité de substrat vis-à-vis de la bilirubine et qui catalyse une réaction dans laquelle de la biliverdine et de l'eau sont formées à partir de bilirubine et d'oxygène. En tant que micro-organismes capables de produire la bilirubine oxydase, ont été mentionnées dans la littérature une espèce

Myrothecium [N. Tanaka et S. Murao, Agric. Biol. Chem., 46, 2499 (1982)] , une espèce Schizophyllum (publication du brevet japonais n° 135886/1984), et des espèces Coprinus, Trametes, Lenzites, Coriolus, Pholiota, Pleurotus et Fomitopsis (publication de brevet japonais n° 198971/1984).

La bilirubine oxydase a présenté des avantages intéressants ces dernières années, en tant que réactif pour déterminer la teneur en bilirubine et pour éliminer la bilirubine qui est source d'erreurs dans l'analyse d'une autre substance biochimique (ou d'autres substances biochimiques) dans des échantillons de sérum, dans le domaine de la chimie clinique. Parmi les échantillons de bilirubine oxydase classiques, l'enzyme provenant de Myrothecium est stable pendant 15 minutes, à 37°C, mais son activité résiduelle tombe à 20% environ, à 70°C. D'un autre côté, l'enzyme provenant de Schizophyllum est stable pendant 10 minutes jusqu'à 45°C seulement. Les échantillons d'enzyme provenant d'autres micro-organismes producteurs, par exemple, l'enzyme provenant de Coprinus présentent une activité résiduelle de 90-95%,

après avoir été maintenus pendant 10 minutes à 60°C et ne donnent pas satisfaction du point de vue de la stabilité thermique. Ils exigent par conséquent un contrôle strict de la température pendant leur production et leurs traitements. Lorsqu'ils sont immobilisés conformément à l'un de leurs modes d'application, ils peuvent être désactivés suivant les conditions de leur immobilisation. Il en résulte qu'ils ne sont pas totalement satisfaisants du point de vue de leur facilité de manipulation.

Les présents inventeurs ont procédé à diverses recherches minutieuses. Ces recherches leur ont permis de découvrir qu'une souche de micro-organismes, la souche B-0891, isolée du sol de Owakidani, Hakone-machi, Ashigara-shimo-gun, Kanagawa-ken, Japon et appartenant à l'espèce Bacillus produit de la bilirubine oxydase capable de catalyser une réaction, dans laquelle de la biliverdine et de l'eau sont formées à partir de bilirubine et d'oxygène, et que la bilirubine oxydase ainsi produite est stable aux environs de 70°C.

La présente invention a été réalisée sur la base de la découverte ci-dessus, et se rapporte à une bilirubine oxydase qui présente des propriétés de thermostabilité et une spécificité de substrat vis-à-vis d'au moins la bilirubine, et catalyse une réaction dans laquelle de la biliverdine et de l'eau sont formées à partir de bilirubine et d'oxygène, ainsi qu'à un procédé d'obtention de la bilirubine oxydase, qui consiste à cultiver un micro-organisme producteur de bilirubine oxydase appartenant à l'espèce Bacillus et, ensuite, à préparer la bilirubine oxydase résultante à partir du bouillon cultivé.

La bilirubine oxydase conforme à la présente invention possède une thermostabilité excellente et, de ce fait, présente très peu de risque d'inactivation ou similaires, lors de son immobilisation en tant que mode d'application enzymatique, ou pendant sa manipulation en tant que mode de diagnostic clinique. Par conséquent, elle est très facile à manipuler.

La présente invention propose cette bilirubine oxydase qui est nouvelle et avantageuse.

On obtiendra facilement une appréciation plus complète de la présente invention et de beaucoup parmi les avantages qui en découlent, de même qu'on en aura une meilleure compréhension, en se référant à la description détaillée suivante qui doit être considérée en liaison avec le dessin annexé, sur lequel :

- la figure 1 montre la bonne thermostabilité pour la bilirubine oxydase conforme à la présente invention ;
- la figure 2 illustre la température optimale de la bilirubine oxydase conforme à la présente invention ;
- la figure 3 démontre la bonne stabilité aux pH de la bilirubine oxydase conforme à la présente invention ; et
- la figure 4 montre le pH optimal pour la bilirubine oxydase conforme à la présente invention.

Dans ce qui suit, on indique certaines caractéristiques taxonomiques du micro-organisme producteur de la nouvelle bilirubine oxydase conforme à la présente invention :

- (I) Caractéristiques morphologiques (obtenues à la suite d'une culture à 30°C, pendant 24 heures, sur un milieu de culture classique d'agar) :
- 1) Forme, taille et pléomorphisme des cellules :
Un bacille discret ou à chaîne courte présentant des bords arrondis.
Taille : 0,5 - 0,8 x 2,0 - 40 μ m.
Pas de pléomorphisme
 - 2) Mobilité et flagelles :
Sans
 - 3) Spore (forme, taille, localisation, gonflement du corps du micro-organisme) :
Une spore ovale ou cylindrique de 0,5 x 1,0 μ m est formé au centre ou à un endroit proche du centre. Le corps du micro-organisme n'est pas gonflé par la spore.
 - 4) Coloration par le Gram

Positive

5) Coloration à l'épreuve des acides :

Négative

(II) Essais de croissance :

- 5 1) Culture en plaques sur agar nutritif (28 - 30°C, 24 heures) :
- Une colonie circulaire, plate et uniforme est formée. La périphérie est irrégulière et la surface est quelque peu sèche. La couleur est blanc grisâtre et aucune matière colorante soluble n'est produite.
- 10 2) Culture inclinée sur agar nutritif (28 - 30°C, 24 heures) :
- Le micro-organisme se développe en lignes et présente une bonne croissance. La couleur est blanc grisâtre et aucune matière colorante soluble n'est produite.
- 15 3) Culture sur liquide (solution de peptone, 28 - 30°C, 24 heures) :
- La croissance est faible et un précipité velu et uniforme se développe.
- 20 4) Lait BCP (28 - 30°C, 24 heures) :
- La solution est rendue alcaline et est peptonisée.

(III) Propriétés physiologiques :

- | | | |
|----|---|---|
| | 1) Réduction des sels de l'acide nitrique | + |
| | 2) Dénitrification | - |
| 25 | 3) Essai MR | - |
| | 4) Essai VP | + |
| | 5) Formation de sulfure d'hydrogène | - |
| | 6) Formation d'indole | - |
| | 7) Hydrolyse de l'amidon | + |
| 30 | 8) Métabolisation des sels de l'acide citrique (milieu de Simmond) | + |
| | Métabolisation des sels de l'acide citrique (milieu de Christensen) | + |
| | 9) Métabolisation des sels de l'acide maléique | + |
| 35 | 10) Métabolisation des sels de l'acide propionique | - |
| | 11) Formation de matière colorante soluble | - |

	12)	Production d'uréase (SSR)	-
		Production d'uréase (Christensen)	-
	13)	Production d'oxydase	+
	14)	Production de lécithinase	-
5	15)	Production de catalase	+
	16)	Gamme de pH de croissance	5,0 - 9,0
	17)	Température de croissance	50°C
			20°C
			15°C
10	18)	Croissance dans des conditions anaérobiques	+
	19)	Essai OF	F
	20)	Hydrolyse de la gélatine	+
	21)	Hydrolyse de la caséine	+
	22)	Hydrolyse de l'esculine	+
15	23)	Hydrolyse de la cellulose	-
	24)	Hydrolyse de la tyrosine	-
	25)	Résistance aux sels	jusqu'à 4%
	26)	Croissance sur milieu de Sabourand	+
	27)	% GC (méthode Tm)	44%
20	IV)	Production d'acides et/ou de gaz à partir de sucres	
		(milieu de culture de base : milieu de culture exempt	
		de peptone, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1,0 g, KCl 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g,	
		extrait de levure 1,0 g, agar 3,0 g, BTB (0,2%) 10,0 ml,	
		eau distillée 1000 ml, pH 7,2) :	

Tableau 1

	Sucre	Acide	Gaz	Sucre	Acide	Gaz
	Adonitol	-	-	D-Mannitol	+	-
	L-Arabinose	+	-	D-Mannose	+	-
5	Cellobiose	+	-	Mélézitose	-	-
	Dulcitol	-	-	Mélibiose	-	-
	méso-Erythritol	-	-	Raffinose	-	-
	D-Fructose	+	-	D-Rhamnose	-	-
	Fucose	-	-	D-Ribose	+	-
10	D-Galactose	(+)	-	Salicine	-	-
	D-Glucose	+	-	L-Sorbose	-	-
	Glycérol	+	-	Sorbitol	-	-
	Inositol	+	-	Amidon	+	-
	Inuline	+	-	Sucrose	+	-
15	Lactose	-	-	Tréhalose	+	-
	Maltose	+	-	D-Xylose	+	-

On déduit des caractéristiques principales décrites ci-dessus que la souche conforme à la présente invention est un micro-organisme consistant en un bacille discret ou à chaîne courte, à bords arrondis, Gram positif et non mobile. Il est catalase positif et oxydase positif et produit des acides par fermentation à partir du glucose. Il se développe à 50°C et la teneur en guanine et en cytosine (%GC) de son acide nucléique est de 44%.

Si l'on se réfère au "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 8ème édition (1974), la présente souche a été jugée être une souche appartenant à l'espèce Bacillus, compte tenu de ses caractéristiques principales décrites

ci-dessus. A la suite d'une étude comparative entre les caractéristiques principales de la présente souche et celles de Bacillus licheniformis, Bacillus cereus et Bacillus coagulans, qui sont des micro-organismes similaires, en référence au Manuel n° 427 "The genus Bacillus", on a trouvé que diverses caractéristiques de Bacillus licheniformis présentent une bonne correspondance avec celles du micro-organisme conforme à la présente invention. Cependant, on a observé des différences en ce qui concerne la mobilité et la résistance aux sels. A partir des résultats ci-dessus, la souche conforme à la présente invention a été estimée appartenir à Bacillus licheniformis et être sa souche variante. Par conséquent, la présente souche a été désignée comme étant la souche "Bacillus licheniformis B-0891".

15 A ce propos, la présente souche a été déposée auprès du Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japon, sous la référence Dépôt BP-952 (FERM BP-952) [date de dépôt : 22 décembre 1984].

20 Pour obtenir la bilirubine oxydase conforme à la présente invention, on cultive le micro-organisme producteur de bilirubine oxydase ci-dessus, de la manière qui est utilisée habituellement pour produire des enzymes et similaires. La culture de ce micro-organisme peut être effectuée soit sur milieu liquide, soit sur milieu solide. En production industrielle, il est avantageux d'inoculer des cellules du micro-organisme producteur de bilirubine oxydase, sur un milieu de culture approprié pour être utilisé dans sa production, et de les soumettre à une culture en immersion et sous agitation avec aération. La composition du milieu de culture pour la culture de bilirubine oxydase peut être choisie parmi une large variété de milieux de culture, qui sont utilisés de manière classique pour la culture de micro-organismes. Sa source d'azote peut être n'importe quel composé azoté métabolisable. Par exemple, on peut employer

de la liqueur de trempage du blé, de la peptone, de la caséine, de la farine de soja, de l'extrait de levure, divers extraits de viande et similaires. N'importe quel composé carboné métabolisable peut être employé comme source de carbone. Par

5 exemple, on peut utiliser des mélasses, du glucose, du glycérol, du sucrose, de la dextrine et similaires. En outre, on peut également utiliser, si besoin est, divers sels minéraux comme le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le dihydrogénophosphate de potassium et l'hydrogénophosphate

10 de potassium. On peut ajuster, d'une manière convenable, la température de la culture, à l'intérieur d'une gamme de températures, dans laquelle le micro-organisme peut se développer et produire la bilirubine oxydase. De préférence, cette température est de 25 - 30°C. Le temps de culture

15 peut varier quelque peu en fonction des conditions. Il est habituellement de 7 à 8 jours environ. Il est inutile de dire qu'il est souhaitable de terminer la culture à un moment approprié, en vérifiant le moment auquel la bilirubine oxydase atteint son activité maximale.

20 Après achèvement de la culture, une méthode classique de préparation d'enzyme peut être utilisée pour purifier l'enzyme à partir du bouillon cultivé. Bien que l'on trouve l'enzyme à la fois dans les cellules et dans le surnageant du bouillon cultivé, on obtient ordinairement l'enzyme, du point de vue

25 de l'efficacité de sa préparation et similaires, à partir du surnageant que l'on obtient en éliminant les cellules du bouillon cultivé. Il est cependant possible de préparer l'enzyme à partir des cellules par une méthode classique et de l'utiliser en combinaison avec celle obtenue à partir du surnageant.

30 La solution d'enzyme brute ainsi obtenue est purifiée par une méthode d'isolement et de purification classique qui est employée pour les protéines, les enzymes et similaires, permettant ainsi d'obtenir la bilirubine oxydase sous sa forme purifiée. Par exemple, une solution contenant

35 de la bilirubine oxydase brute peut être soumise à une méthode de précipitation fractionnée, utilisant un solvant

organique tel que l'acétone, le méthanol ou l'éthanol, ou à une méthode de relargage employant le sulfate d'ammonium, le chlorure de sodium ou le sulfate d'aluminium, provoquant ainsi la précipitation de l'enzyme à partir de la solution et sa récupération sous une forme brute.

En vue de la purification subséquente de l'enzyme brute qui peut être réalisée si nécessaire, le précipité est dissous dans un solvant tel qu'un tampon tris-HCl. On purifie ensuite la solution résultante en combinant d'une manière appropriée une chromatographie d'adsorption, qui utilise une résine échangeuse d'ions telle que la diéthylaminoéthyl-cellulose, un gel de diéthylaminoéthyl-dextrane ou un gel d'aminoéthyl-dextrane quaternaire, et une chromatographie d'adsorption qui utilise un adjuvant de filtration gélifié tel qu'un gel de dextrane ou un gel de polyacrylamide. Ensuite, elle est séchée par une technique telle que la lyophilisation, pour obtenir la bilirubine oxydase sous sa forme purifiée.

On indique dans ce qui suit les propriétés physiques et chimiques de la bilirubine oxydase ainsi obtenue :
(I) Méthode de mesure de l'activité :

	Tampon tris-HCl 0,2 M	0,5 ml
	(pH 8,0, renfermant de l'EDTA 1 mM)	
	Eau	0,94 ml
25	Solution de bilirubine oxydase	0,05 ml

On place un mélange réactionnel (1,40 ml) ayant la composition ci-dessus dans un petit tube à essai. Après avoir chauffé ledit mélange à 37°C, on ajoute 0,01 ml d'une solution de bilirubine 10 mM, pour initier la réaction. On fait réagir à 37°C pendant 10 minutes. Après la réaction, on ajoute 1,5 ml de CPC (chlorure de N-cétylpyridinium) à 1%, pour achever la réaction, et on soumet le mélange réactionnel à une analyse colorimétrique, à 453 nm, pour déterminer son absorbance $[S]$. D'autre part, comme témoin, on a ajouté 0,01 ml d'une solution de bilirubine à un mélange réactionnel (1,44 ml) du même type que le mélange réactionnel employé

ci-dessus, à ceci près qu'il ne contenait pas de solution d'enzyme. On a fait incuber le mélange résultant à 37°C pendant 10 minutes précisément. Ensuite, on a ajouté successivement 1,5 ml de CPC à 1% et 0,05 ml de la solution de bilirubine oxydase. On a soumis le mélange ainsi préparé à l'analyse colorimétrique, à 453 nm, pour déterminer son absorbance [B]. L'activité enzymatique est calculée conformément à l'équation suivante :

$$\text{Activité enzymatique (U/ml)} = \frac{([B] - [S]) \times 3,0}{60,7 \times 10 \times 0,05}$$

dans laquelle 1 unité (U) de l'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui oxyde 1 μ mole de bilirubine par minute dans les conditions décrites ci-dessus.

(II) Spécificité de substrat :

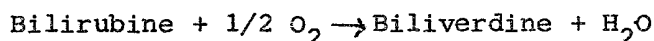
A l'aide d'électrodes à oxygène, on a recherché la spécificité par rapport à différents substrats, sur la base des taux de consommation d'oxygène. Les résultats sont résumés dans le Tableau 2. Chacun des substrats a été utilisé en une quantité de 0,1 mM, tandis que l'enzyme a été utilisée en une quantité de 0,005 U.

Tableau 2

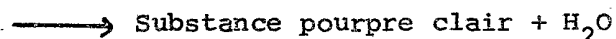
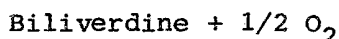
	Activité relative(%)
Bilirubine	100
Biliverdine	0,51
Pyrogallol	92,9
Catéchol	64,9
Chlorophylline	82,5
Phénol	0,0
Amino-4 antipyrine	0,0
Hémine	0,0
Hémoglobine	0,0

(III) Réaction enzymatique :

La réaction suivante est catalysée.



Cependant, l'oxydation de la biliverdine pour donner une substance pourpre clair, qui est montrée par l'équation suivante, a lieu dans une mesure extrêmement faible.



(IV) Thermostabilité :

Après avoir traité des fractions de l'enzyme pendant 10 minutes, à diverses températures se situant respectivement dans la gamme de 30°C à 100°C, on refroidit lesdites fractions dans un mélange eau-glace. Ensuite, leurs activités résiduelles sont mesurées par la méthode de l'essai de l'activité enzymatique. Les résultats sont présentés sur la FIGURE 1. L'activité de la bilirubine oxydase conforme à la présente invention reste stable jusqu'à environ 70°C, et plus de 50% de son activité subsiste même à 90°C.

(V) Température optimale :

A l'aide du mélange réactionnel et de la méthode de mesure employés dans la méthode d'essai (I) ci-dessus, on a recherché l'influence de la température à diverses températures.

Les résultats sont montrés sur la FIGURE 2. On a trouvé que la température optimale pour la bilirubine oxydase conforme à la présente invention se situe autour de 80°C.

(VI) Stabilité aux pH :

On a mis à incuber des fractions de la présente enzyme, à 37°C, pendant 1 heure, dans des tampons présentant respectivement différents niveaux de pH. Ensuite, leurs activités ont été mesurées par la méthode d'essai décrite ci-dessus, pour déterminer l'influence du pH.

Les résultats sont montrés sur la FIGURE 3, sur laquelle $\odot - \odot$, $\circ - \circ$, $\bullet - \bullet$ et $\ominus - \ominus$ correspondent respectivement au tampon acétate (pH 4,0 - 6,0), au tampon acide

diméthylglutarique-NaOH (pH 7,5 - 9,0), au tampon phosphate (pH 6,5 - 8,0) et au tampon tris-HCl (pH 7,5 - 9,0). On a trouvé que la bilirubine oxydase conforme à la présente invention est stable aux environs des valeurs de pH de 7 à 9.

5 (VII) pH optimal :

On a recherché l'influence du pH sur l'activité de l'enzyme de la présente invention, en utilisant des tampons de différents niveaux de pH en tant que tampons dans la méthode d'essai décrite ci-dessus.

10 Les résultats sont montrés sur la FIGURE 4, sur laquelle $\odot$ - $\odot$, $\bigcirc$ - $\bigcirc$, $\bullet$ - $\bullet$ et $\textcircled{1}$ - $\textcircled{1}$ correspondent respectivement au tampon acétate (pH 4,0 - 6,0), au tampon acide diméthylglutarique-NaOH (pH 7,5 - 9,0), au tampon phosphate (pH 6,5 - 8,0) et au tampon tris-HCl (pH 7,5 - 9,0). On a trouvé
15 que le pH optimal pour la bilirubine oxydase de cette invention se situe aux environs de la valeur de pH 8.

(VIII) Inhibition et activation :

La bilirubine oxydase conforme à la présente invention est inhibée par les ions métalliques Cu^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} ,
20 par CPC et le Cation FB (marque déposée ; produit de Nippon Oils and Fats Co., Ltd.) et activée par FAD.

(IX) Poids moléculaire :

50 000 $\pm$ 10 000 (mesuré par filtration de gel sur "Sephacryl S-300").

25 (X) Point isoélectrique :

A la suite d'une mesure par électrolyse isoélectrique, on a trouvé que le point isoélectrique se situait aux environs de la valeur de pH 3,35.

(XI) Valeur K_m :

30 $2,86 \times 10^{-5}$ M (à pH 8,0).

Dans le Tableau 3, on a comparé l'enzyme conforme à la présente invention avec des échantillons de bilirubine oxydase classiques.

Tableau 3

	Echantillon de la présente invention	Echantillon n°1 de la technique anté- rieure *	Echantillon n°2 de la technique anté- rieure **	Echantillon n°3 de la technique anté- rieure ***
Poids moléculaire	50 000	44 000	58 000	52 000
Point isoélectrique	3,35	3,98	6,0 - 6,1	4.1
Thermostabilité ****	70°C	60°C	45°C	37°C
Température optimale	80°C	50 - 60°C	50°C	40°C
Stabilité aux pH	7 - 9	5 - 11	7,5 - 8	5,0 - 9,7
pH optimal	8	6 - 9	5,5 - 6	8
Valeur Km	$2,86 \times 10^{-5}$ M	-	-	$1,9 \times 10^{-4}$ M

* Provenant de Coprinus

** Provenant de Schizophyllum

*** Provenant de Myrothecium

**** La température maximale conduisant à une activité résiduelle de 90%
ou plus dans le traitement à la chaleur pendant 10 minutes.

Comme cela a été décrit, ci-dessus, l'enzyme conforme à la présente invention est différente de n'importe lequel des échantillons de bilirubine oxydase connus, en ce qui concerne ses diverses caractéristiques enzymochimiques et physiochimiques. En ce qui concerne la thermostabilité, l'activité résiduelle après un traitement à 60°C pendant 10 minutes est de 90-95% même dans le cas de la bilirubine oxydase provenant de Coprinus, qui a la meilleure thermostabilité parmi les échantillons de bilirubine oxydase classiques, alors que la bilirubine oxydase conforme à la présente invention reste stable jusqu'à 70°C dans le même traitement de 10 minutes et montre encore une activité résiduelle aussi élevée que 50% même après avoir été traitée à 90°C pendant 10 minutes. En conséquence, la bilirubine oxydase conforme à la présente invention est considérée comme étant une enzyme hautement thermostable. En outre, l'enzyme conforme à la présente invention présente une très faible valeur Km, soit de $2,86 \times 10^{-5} \text{ M}$ et sa réactivité est extrêmement bonne.

Ayant maintenant décrit la présente invention d'une manière générale, on la comprendra encore mieux en se référant à un exemple spécifique qui est donné ici dans un but illustratif seulement et n'est pas destiné à limiter la portée de la présente invention, sauf indication contraire.

Exemple :

On a inoculé le micro-organisme Bacillus licheniformis B-0891 (FERM BP-952), dans un flacon Erlenmeyer de 500 ml, qui contenait 100 ml d'un milieu de culture (stérilisé à 120°C pendant 20 minutes ; pH : 7,5) contenant 1,0%(P/V) de sucrose, 1,0% (P/V) d'extrait de levure ("Meast[®]", produit de "Asahi Breweries, Ltd.", Tokyo, Japon), 0,3% (P/V) de NaCl, 0,05% (P/V) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 0,1% (P/V) de K_2HPO_4 , et on l'a ensuite cultivé en le soumettant à des secousses à 30°C pendant 24 heures, pour obtenir une culture de semence. Ensuite, on a inoculé la culture de semence dans un fermenteur, présentant une capacité de 30 l et contenant 20 l d'un milieu de culture (stérilisé à 120°C pendant 20 minutes ; pH 7,5 ;

renfermant 0,1% d'un agent anti-mousse "Disfoam CB-442, marque déposée ; produit de Nippon Oils & Fats Co., Ltd") présentant la même composition que le milieu de culture ci-dessus et on l'a cultivé sous agitation avec aération, à 30°C, et

5 300 tours par minute, pendant 8 jours, et dans des conditions d'aération de 20 l/minute. Après achèvement de la culture, on a centrifugé le bouillon cultivé (à 5000 tours par minute pendant 15 minutes), pour obtenir un surnageant (13,8 l, 200 U). On a soumis le surnageant à une ultrafiltration

10 (sur un appareil à module), pour le concentrer à 1,96 l. Ensuite, on a ajouté au concentré résultant de l'acétone réfrigérée, en un volume de 0,6 fois celui du concentré, et l'on a fait suivre par une centrifugation (à 5000 tours par minute pendant 15 minutes), pour éliminer les matières insolubles.

15 Ensuite, on a ajouté au concentré ainsi préparé, de l'acétone réfrigérée, en un volume de 1,6 fois celui du concentré, de façon à faire précipiter une fraction active de bilirubine oxydase. La fraction active de bilirubine oxydase a été éliminée par centrifugation (à 5000 tours par minute pendant 15 minutes), et on a dissous le précipité dans un

20 tampon tris-HCl 0,2 M, pour obtenir une solution enzymatique d'un volume de 205 ml (200 U). En utilisant un tube d'acétate de cellulose, on a dialysé la solution enzymatique, pendant toute une nuit, contre 15 litres de tampon tris-HCl

25 10mM (pH 7,5). Ensuite, on a fait adsorber le dialysat sur une colonne DEAE-Sepharose CL-6B (5,0 x 14,5 cm) qui avait été tamponnée par avance avec le tampon ci-dessus. Ensuite, la colonne a été soumise à une élution avec gradient de densité à l'aide de solutions 0-1,0 molaire en chlorure de po-

30 tassium. On a récupéré les fractions actives enzymatiques éluées avec des concentrations en chlorure de potassium de 0,3-0,5 mole, pour recueillir l'enzyme conforme à la présente invention. Ensuite, on a concentré les fractions actives de bilirubine oxydase sur une membrane d'ultrafiltration "XM-50"

35 (marque déposée ; produit de Amicon, Corp.), et l'on a fait suivre par leur développement avec un tampon tris-HCl 10 mM

(pH 7,5) sur une colonne Sephacryl S-200 (3,6 x 80 cm). On a récupéré les fractions actives de bilirubine oxydase éluées lors du passage de 580 à 640 ml d'agent de développement et on les a ensuite lyophilisées, pour obtenir 350 mg (90,0 U) de bilirubine oxydase sous sa forme pulvérulente.

Ayant maintenant décrit complètement la présente invention, il apparaîtra à l'homme de l'art que de nombreux changements et de nombreuses modifications peuvent y être apportés, sans que l'on s'écarte pour autant de l'esprit ou du domaine de la présente invention telle qu'elle a été définie ici.

REVENDEICATIONS

1 - Bilirubine oxydase présentant une spécificité de substrat vis-à-vis d'au moins la bilirubine et capable de catalyser une réaction dans laquelle de la biliverdine et de l'eau sont formées à partir de bilirubine et d'oxygène, caractérisée par le fait que ladite bilirubine oxydase est au moins thermostable.

2 - Bilirubine oxydase selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle est thermiquement stable pendant 10 minutes aux environs de 70°C.

3 - Bilirubine oxydase selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle présente les propriétés physiques et chimiques suivantes :

- (a) poids moléculaire : $50\ 000 \pm 10\ 000$ (mesuré par filtration de gel sur "Sephacryl S-300") ;
- (b) point isoélectrique : environ pH 3,35 ;
- (c) valeur Km : environ $2,86 \times 10^{-5}$ M ;
- (d) pH optimal : environ pH 8 ;
- (e) stabilité aux pH : stable aux environs de pH 7 - 9 ;
- (f) température optimale : environ 80°C ; et
- (g) thermostabilité : stable jusqu'à environ 70°C.

4 - Procédé d'obtention de bilirubine oxydase, caractérisé par le fait qu'il consiste à cultiver un micro-organisme producteur de bilirubine oxydase appartenant à l'espèce Bacillus et ensuite à préparer la bilirubine oxydase résultante à partir du bouillon cultivé.

5 - Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que l'on utilise le micro-organisme Bacillus licheniformis, comme micro-organisme producteur de bilirubine oxydase appartenant à l'espèce Bacillus.

6 - Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que l'on utilise la souche Bacillus licheniformis B-0891 (FERM BP-952), comme micro-organisme producteur de bilirubine oxydase appartenant à l'espèce Bacillus.

2576909

FIG. 2

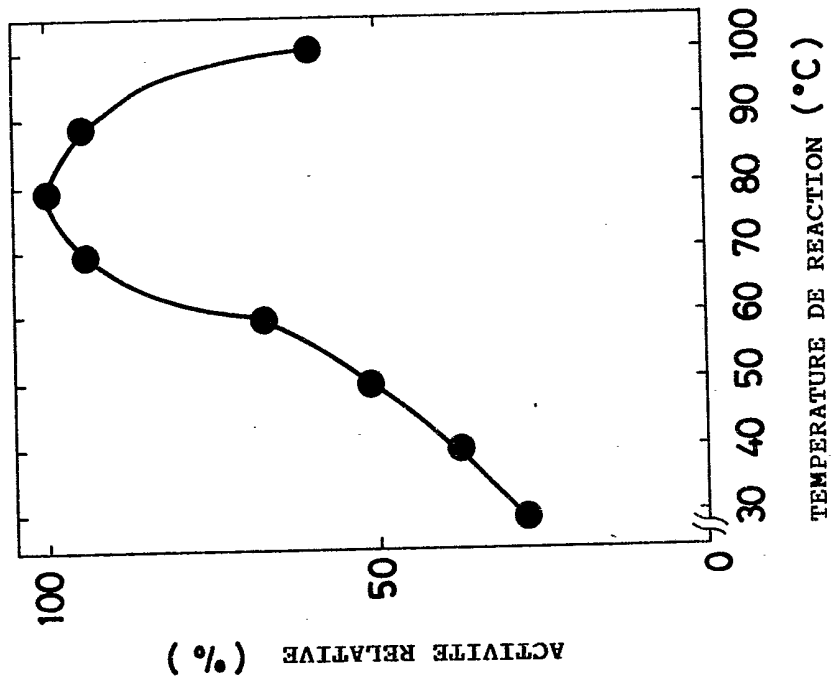


FIG. 1

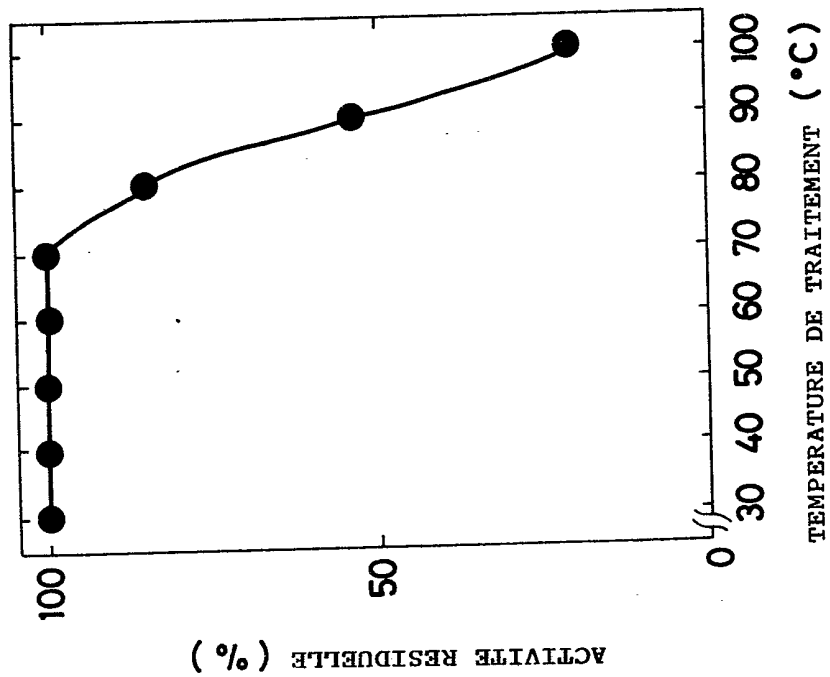


FIG. 4

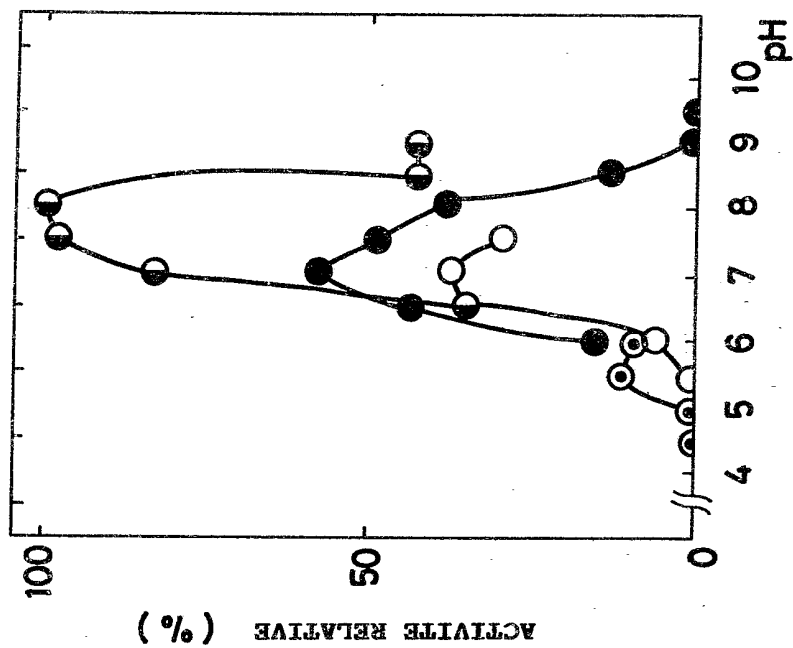


FIG. 3

