

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

**N° 80 11079**

---

⑤④ Procédé de purification de solutions contenant de la levane-saccharase.

⑤① Classification internationale (Int. Cl.<sup>3</sup>). C 12 N 9/10.

⑫② Date de dépôt..... 19 mai 1980.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 47 du 20-11-1981.

---

⑦① Déposant : BEGHIN-SAY S.A., résidant en France.

⑦② Invention de : Patrice Perlot et Pierre Frédéric Monsan.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Jean-Pierre Quéré, Béghin-Say,  
B.P. 47.108, 75360 Paris Cedex 08.

La présente invention concerne un procédé de purification de la lévane saccharase.

5 La lévane saccharase est une fructosyl-transférase qui permet de synthétiser un polyfructose à partir de saccharose. En particulier la  $\beta$ -2-6-fructane D glucose-1-fructosyl transférase ; EC.2.4.1.10 permet d'obtenir un homo-polymère ramifié de D-fructose : la chaîne principale du polymère résulte de liaisons  $\beta(2 \rightarrow 6)$  entre les  
10 résidus de D-fructose et les branchements correspondent à des liaisons  $\beta(2 \rightarrow 1)$ .

Les applications de ce polyfructose ou lévane sont variées : entre autres, il peut être substitué à l'amidon, aux dextrane, xanthane, pullulane ou bien être hydro-  
15 lysé de façon à préparer des solutions concentrées de fructose.

20 DEDONDER et coll. (Bull. Soc. Chim. Biol. 45, 477-491, 1963) ont décrit une méthode de purification de la lévane saccharase comportant trois étapes :

- 1) précipitation à l'éthanol.
- 2) précipitation au sulfate d'ammonium.
- 25 3) chromatographie sur hydroxyl-apatite.

Les activités spécifiques élevées ( $150 \text{ ULS/mg}^{-1}$  de protéine) sont obtenues au détriment du rendement de la purification de l'enzyme.

30 L'invention vise à pallier cet inconvénient et permet de purifier des lévanes saccharases de haute activité spécifique avec un rendement très élevé.

35 Le procédé de purification est caractérisé en ce qu'il

comporte :

a) une étape d'acidification du milieu de fermentation en fin de croissance bactérienne.

5 b) une étape de centrifugation.

c) une étape d'ultrafiltration des surnageants de fermentation.

10 d) une étape d'élimination des acides nucléiques et des pigments rouges.

e) une étape de fractionnement des protéines.

15 De préférence le pH de l'étape d'acidification est ajusté à 6,0 et la centrifugation ultérieure est opérée à 4°C pendant 20 minutes à 5 000 g.

20 Les acides nucléiques et les pigments rouges sont précipités par addition de sulfate de protamine.

L'invention sera mieux comprise grâce aux exemples détaillés donnés ci-après concernant la production et la purification de la lévane saccharase.

25 La souche bactérienne utilisée pour produire la lévane saccharase est le Bacillus Subtilis C<sub>4</sub> mutant constitutif du Bacillus Subtilis B.S.5 hyperproducteur de lévane saccharase exocellulaire.

30 La composition du milieu de culture est donnée dans le Tableau 1.

35

Solution A	
Sulfate d'ammonium	3,3 g.l <sup>-1</sup>
Phosphate de potassium dipotassique	12,2 g.l <sup>-1</sup>
Phosphate de potassium monopotassique	4,1 g.l <sup>-1</sup>
Glycérol	10 g.l <sup>-1</sup>
Solution B	
Sulfate de magnésium	0,060 g.l <sup>-1</sup>
Sulfate de manganèse	0,017 g.l <sup>-1</sup>
Fer (III) citrate ammoniacal	0,022 g.l <sup>-1</sup>
Solution C	
Antimousse RHODORSIL 410	1 à 2 g.l <sup>-1</sup>

TABLEAU 1

Afin d'éviter la précipitation des sels au cours de la stérilisation, le milieu est stérilisé en trois parties (solutions A,B,C).

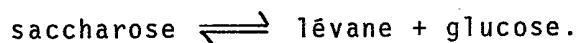
Les sels et l'antimousse sont ajoutés stérilement avant inoculation.

Les conditions de culture sont données dans le tableau 2.

pH initial	7,0
Température	37° C
Aération	Volume d'air injecté par volume de milieu et par minute compris entre 0,7 et 3 l.l <sup>-1</sup> . mn <sup>-1</sup>

TABLEAU 2

L'activité de la lévane saccharase est mesurée en déterminant la libération du glucose dans la réaction :



La synthèse des lévanes est effectuée dans les conditions données dans le tableau 3, pour un volume total de 1 ml.

Température : 37° C.  
 x ml de solution enzymatique  
 y ml de tampon phosphate 0,05 M, pH 5,8  
 0,3ml de solution de saccharose 1 M dans du tampon phosphate 0,5 M pH 5,8

TABLEAU 3

L'unité d'activité enzymatique (ULS) est définie comme étant la quantité de lévane saccharase qui libère 1  $\mu$ mole de glucose par minute dans les conditions définies

dans le tableau 3.

L'influence des divers paramètres sur la vitesse de croissance bactérienne et l'activité de la lévane saccharase est précisée dans le tableau 4.

Débit d'aération lh <sup>-1</sup>	Vitesse d'agitation tr. mn <sup>-1</sup>	Concentration d'antimousse	Taux de croissance h <sup>-1</sup>	Activité ULS.ml <sup>-1</sup>
350	700	0	0,52	1,85
380	700	1 %.	0,37	21,6
450	1300	1 %.	0,56	21,0

TABLEAU 4

On notera que le rôle de l'antimousse est très important puisqu'il permet d'obtenir des lévanes saccharases d'activité très élevée (21 ULS.ml<sup>-1</sup> contre 1,85 ULS.ml<sup>-1</sup>).

La figure 1 montre que si la culture du *Bacillus Subtilis* est effectuée dans un milieu standard - sans antimousse - l'activité de la lévane saccharase décroît très rapidement lorsque la concentration cellulaire augmente.

En fin de croissance bactérienne, lorsque l'activité de la lévane saccharase du milieu de fermentation est maximale, le pH est ajusté à 6,0 puis le milieu est centrifugé à 4° C pendant 20 mn à 5000 g.

Les surnageants de fermentation contenant la lévane

saccharase sont concentrés par ultrafiltration à 4° C dans un module SARTORIUS SM 16525 garni de cinq membranes SM 12136 ayant un seuil de coupure de 10 000 daltons.

5 En ultrafiltrant pendant 22 heures 9 litres de surnageant de culture contenant 11 ULS.ml<sup>-1</sup> on obtient 420 ml de solution ayant une activité lévane saccharase de 173 ULS.ml<sup>-1</sup>.

10 Le rendement d'ultrafiltration en activité enzymatique est de 73,5 %.

Les solutions de lévane saccharase obtenues par ultrafiltration contiennent des acides nucléiques et des pigments rouges.

15 L'addition de sulfate de protamine dans du tampon phosphate 0,05 M pH 5,8 jusqu'à une concentration finale de 2 % permet de précipiter totalement ces impuretés.

20 A titre d'exemple, lorsqu'on traite ainsi une solution de lévane saccharase d'activité 130 ULS.ml<sup>-1</sup>, on obtient une solution purifiée d'activité 111 ULS.ml<sup>-1</sup>.

25 Le rendement en activité enzymatique de cette étape est donc de 90 %.

Les surnageants de filtration ultrafiltrés et purifiés contiennent des protéines que l'on élimine par perméation de gel.

30 On utilise à cette fin une colonne de 800 ml d'ULTROGEL AcA 34 (I.B.F.) qui permet de chromatographier 100 ml de solution ultrafiltrée.

Le rendement en activité enzymatique de la perméation de gel est de 90 %.

35 Le tableau 5 rappelle les divers rendements des étapes du procédé de purification de la lévane saccharase selon

l'invention.

5	Etape	Rendement %	Rendement global %
	Ultrafiltration	73,5	73,5
10	Précipitation du sulfate de protamine	90	66,15
	Perméation de gel	90	59,5

15 TABLEAU 5

Ainsi, le procédé selon l'invention permet d'obtenir une  
lévane saccharase d'activité spécifique de  $150 \text{ ULS.mg}^{-1}$   
de protéine avec un rendement de 59,5 %.

20 Pour mémoire, il est rappelé que DEDONDER et col. n'ob-  
tenaient qu'un rendement de 15 %.

25

30

35



REVENDICATIONS  
=====

1. Procédé de purification de solutions contenant de la lévane saccharase, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes succesives suivantes :
  - 5 a) acidification du milieu de fermentation en fin de croissance bactérienne.
  - b) ultrafiltration des surnageants de fermentation.
  - 10 c) élimination des acides nucléiques et des pigments rouges.
  - d) fractionnement des protéines.
- 15 2. Procédé de purification de solutions contenant de la lévane saccharase selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape d'acidification consiste à ajuster le pH de la solution à 6,0.
- 20 3. Procédé de purification de solutions contenant de la lévane saccharase selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'étape d'ultrafiltration est conduite à 4° C.
- 25 4. Procédé de purification de solutions contenant de la lévane saccharase selon l'une des revendications 1 et 3, caractérisé en ce que le dispositif d'ultrafiltration est garni de membranes ayant un seuil de coupure de 10 000 daltons.
- 30

5. Procédé de purification de solutions contenant de la lévane saccharase selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'élimination des acides nucléiques et des pigments rouges est réalisée par addition de sulfate de protamine.
- 5
6. Procédé de purification de solutions contenant de la lévane saccharase selon la revendication 5, caractérisé en ce que le sulfate de protamine est en solution dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 5,8.
- 10
7. Procédé de purification de solutions contenant de la lévane saccharase selon l'une quelconque des revendications 1, 5 ou 6, caractérisé en ce que l'addition de sulfate de protamine est opérée jusqu'à ce que sa concentration finale soit de 2 %.
- 15
- 20
8. Procédé de purification de solutions contenant de la lévane saccharase selon la revendication 1, caractérisé en ce que les protéines sont fractionnées par permation de gel.
- 25

2482620

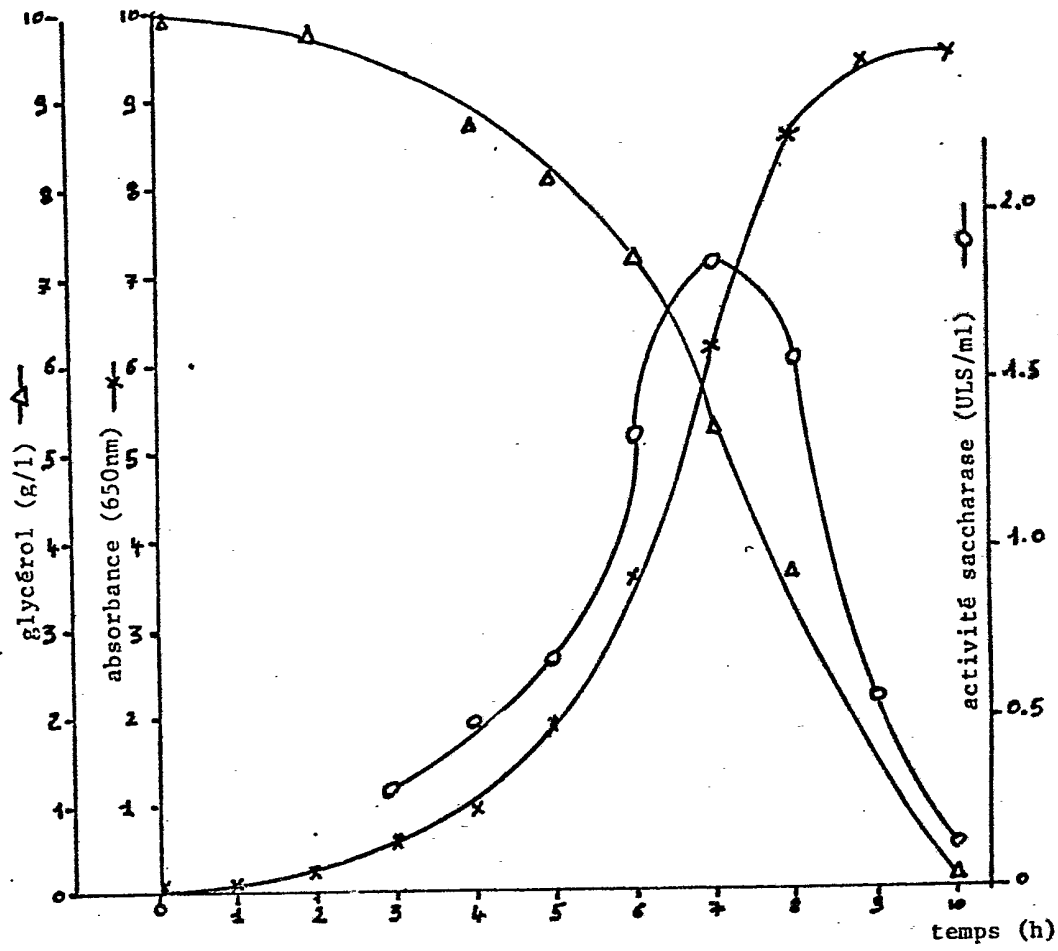


Figure 1