

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 82 15053

⑤④ Procédé de préparation de sphingomyélinase.

⑤① Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 9/16 // C 12 R 1/465.

②② Date de dépôt..... 3 septembre 1982.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : JP, 9 septembre 1981, n° 140 902/81.

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 10 du 11-3-1983.

⑦① Déposant : Société dite : TOYO JOZO COMPANY, LTD. — JP.

⑦② Invention de : Shigeyuki Imamura, Hideo Misaki et Naoki Muto.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Flechner,
22, av. de Friedland, 75008 Paris.

Procédé de préparation de sphingomyélinase.

La présente invention est relative à un procédé de préparation de sphingomyélinase par un processus de fermentation et, plus particulièrement, à un procédé de préparation de sphingomyélinase en cultivant un microorganisme produisant de la sphingomyélinase et appartenant au genre Streptomyces dans un milieu et en recueillant la sphingomyélinase obtenue dans le milieu de culture.

On connaît jusqu'ici, comme bactéries produisant de la sphingomyélinase, Staphylococcus aureus et Bacillus cereus qui agissent sur la sphingomyéline pour donner du céramide et de la phosphorylcholine.

On a recherché des microorganismes produisant la sphingomyélinase mentionnée ci-dessus et on a trouvé que parmi les microorganismes du sol, Streptomyces sp. A 9107, un type d'actinomycetes, produit l'enzyme suivant l'invention.

Streptomyces sp. A 9107 est une souche séparée du sol d'un champ de radis, à Heda Mura, Tagata Gun, Département de Shizuoka, Japon, et ses caractéristiques mycologiques sont les suivantes :

(I) Forme.

L'observation à l'oeil nu montre que le mycelium aérien, ayant des spores mûrs, est brun à gris, et que le mycelium du substrat est jaune à brun

jaunâtre et ne produit pas de matières colorantes solubles.

Les résultats de l'observation, après culture dans des milieux amidon-sel minéral-gélose à 30°C pendant 10 jours, sont les suivants, bien que l'on observe également la même forme quand on utilise des milieux farine d'avoine-gélose, et des milieux extraits de levure-extrait de malt-gélose.

Le mycélium aérien a une forme linéaire à ondulée d'un diamètre de 0,8 à 1,0 micron, et croît en branches simples pour former des chaînes de nombreux spores. La chaîne de spores a une forme linéaire à ondulée, sans former de spirales. Le spore est constitué d'une colonne courte, d'une dimension de 1,0 à 1,2 x 1,5 à 2,0 microns, et sa surface est lisse. Le mycélium du substrat, d'un diamètre de 0,5 à 0,7 micron, croît suivant des ondulations ou des courbes qui forment des branches et on n'observe pas de séparation du mycélium et de générations de spores. Il ne se forme ni spore de flagellés, ni sporange.

(II) Formation d'acide diaminopimélique.

On détecte l'acide L-diaminopimélique.

(III) Culture.

Les résultats de l'observation après une culture à 30°C pendant 20 jours sur divers milieux sont consignés au tableau. La couleur est indiquée suivant la classification des couleurs décrites dans Color Harmony Manual 4ème édition, 1958, Container Corporation of America.

Conditions sur divers milieux

Nom du milieu	Croissance	Couleur du mycélium de substrat	Mycélium aérien	Matière colorante soluble
Milieu saccharose. nitrate.gélose	Faible	Incolore	Faible : blanc d'huitre (b)	Aucune
Milieu glucose. asparagine.gélose	Modérée	Or moutarde (2pe)	Modéré à médiocre : blanc (a)	Aucune
Milieu glycérine. asparagine.gélose	Modérée à bonne	Or moutarde (2pe)	Modéré à bon : nacré (2ba)	Aucune
Milieu amidon.Sel minéral.gélose	Modérée à bonne	Brun doré (3pg)	Modéré à bon : gris argent (3fe) à naturel (3dc)	Aucune
Milieu tyrosine. gélose	Modérée à bonne	Brun doré (3pg)	Modéré à bon : nacré (3ba)	Aucune
Milieu farine d'avoine.gélose	Modérée à bonne	Or moutarde (2pg)	Médiocre : blanc (a) à nacré (3ba)	Aucune
Milieu extrait de levure.extrait de malt.gélose	Bonne	Or moutarde (2pg) à brun doré (3pg)	Bon : gris argent (3fe) à naturel (3dc)	Aucune
Milieu glycérine. nitrate.gélose	Modérée à médiocre	Or moutarde (2pg)	Médiocre: nacré (3ba)	Aucune

Conditions sur divers milieux (suite 1)

Nom du milieu	Croissance	Couleur du mycélium de substrat	Mycélium aérien	Matière colorante soluble
Milieu gélosé de Bennett	Modérée à bonne	Or moutarde (2pg)	Modéré : nacré (2ba) à crème (1 1/2 ca); partiellement sable (3cb)	Aucune
Milieu gélosé d'Emerson	Bonne	Or moutarde (2pe à 2pg)	Faible : blanc (a)	Aucune
Milieu gélosé nutritif	Médiocre	Froment clair (2ea)	Aucun	Aucune

(IV) Propriétés physiologiques.

- (1) Gamme de température
de croissance 10 à 40°C
- (2) Liquéfaction de la gélatine : positif
- 5 (3) Hydrolyse de l'amidon : positif
- (4) Lait écrémé : positif tant pour la peptonisation que pour la coagulation.
- (5) Formation de substances colorantes semblables à la mélamine : négatif
- 10 (6) Utilité des sucres : positif vis-à-vis du L-arabinose, du D-fructose, du D-glucose, et du D-xylose ; négatif vis-à-vis de l'i-inositol, du D-mannitol, du raffinose, du L-rhamnose et du saccharose.
- 15 Comme décrit ci-dessus, la souche A 9107 produit des mycélium aériens ayant des chaînes de nombreux spores à partir de vrais mycélium de substrat ne provoquant pas de séparation, et contient également de l'acide L-diaminopimélique. A partir de ces faits,
- 20 ainsi que du diamètre du mycélium et de la dimension du spore, la souche A 9107 doit appartenir à Streptomyces sp. En conséquence, on a désigné la souche A 9107 par Streptomyces sp. A 9107 et on l'a déposée à l'Institut de Recherche pour la Fermentation, Agence de la Science Industrielle et de la Technologie au Japon, sous la désignation FERM-P 4978, et au Service de la Recherche en Agriculture au Département de l'Agriculture des Etats-Unis d'Amérique, sous la désignation NRRL 15100.
- 25
- 30 A titre de microorganismes utilisés suivant l'invention, on peut utiliser non seulement le Streptomyces sp. A 9107 mentionné ci-dessus, mais également n'importe quelle moisissure appartenant au genre Streptomyces et produisant de la sphingomyélinase.
- 35

Comme milieu de culture utilisé, suivant l'in-
vention, on préfère celui contenant, en poids, de 1 à
5 % de protofroment, 0,5 à 3 % de l'amidon de maïs,
de 0,1 à 0,5 % de KCl, de 0,1 à 0,5 % de CaCO_3 et
5 de 0,1 % de Disfoam BC-51Y, ayant un pH de 7,0. On
effectue la culture entre 24 et 28°C pendant 40 à 50
heures, sous aération et en agitant. On prépare ainsi
de la sphingomyélinase qui s'accumule dans la solution
de culture.

10 En recueillant la sphingomyélinase dans la
solution de culture, après achèvement de celle-ci, et
en la purifiant, de la sphingomyélinase sécrétée des
mycélium peut être obtenue sous la forme d'une prépa-
15 ration enzymatique, seule à l'analyse électrophorétique,
par diverses opérations, telles qu'un relargage par
des sels minéraux (par exemple du sulfate d'ammonium),
une précipitation fractionnée par les solvants organi-
ques (par exemple l'acétone, l'éthanol), par chromato-
20 graphie par adsorption sur des supports échangeurs de
cations (par exemple cellulose-CM, Sepharose, Sepha-
dex, Sephadex-SP), par chromatographie avec tamis
moléculaire sur des agents de filtration de gel (par
exemple Sephadex G-75, G-100, Biogel P-100), etc.

Les propriétés de l'enzyme obtenu sont les
25 suivantes :

(1) Action.

Cet enzyme agit sur la sphingomyéline pour
catalyser la réaction produisant du céramide et de
la phosphorylcholine.

30 (2) Mesure de l'activité enzymatique.

Après avoir préincubé 0,45 ml du mélange ré-
actionnel suivant à 37°C, on ajoute 50 μl d'une solu-
tion enzymatique pour faire démarrer la réaction.
Juste 10 minutes après, on ajoute 0,1 ml d'acide
35 éthylène-diamine-tétracétique 0,1 M pour arrêter la

réaction.

	- Tampon de Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)	0,2 ml
	- $MgCl_2$ 10 mM	0,05 ml
	- Emulsion de sphingomyéline 10 mM	0,05 ml
5	- Triton X-100 à 5 %	0,05 ml
	- H_2O	0,10 ml.

La phosphorylcholine formée est envoyée à un système de développement des couleurs par H_2O_2 , en utilisant le mélange réactionnel suivant, et on mesure l'absorbance à 500 nm.

	- COD (50 μ /ml)	0,1 ml
	- Phosphatase alcaline (40 μ /ml)	0,1 ml
	- POD (45 μ /ml)	0,1 ml
	- 4-aminoantipyrine à 0,3 %	0,1 ml
15	- Phénol à 0,2 %	0,1 ml
	- H_2O	1,9 ml.

L'indication de l'activité enzymatique est calculée par l'équation suivante, avec une activité pour produire 1 μ mole de phosphorylcholine pendant 1 minute servant d'unité :

$$\text{Unité/ml} = \Delta A_{500 \text{ nm}} \times 0,25 \times 20 \times 1/10$$

dans laquelle $\Delta A_{500 \text{ nm}}$ signifie la différence d'absorbance à 500 nm entre le début de la réaction et 10 minutes après la réaction.

(3) pH optimum.

On mesure les activités enzymatiques en utilisant un tampon diméthylglutarate-NaOH 0,2 M (pH de 5 à 7), un tampon Tris-HCl 0,2 M (pH de 7,2 à 9) et un tampon glycine-NaOH 0,2 M (pH de 9,5 à 10) au lieu du tampon Tris-HCl dans le mélange réactionnel utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique. Les résultats sont illustrés à la figure 1. L'enzyme agit au mieux à un pH de 7 à 8.

(4) Stabilité du pH.

On dissout une liqueur enzymatique dans 100 mM de divers tampons, tels que le tampon diméthylglutarate-NaOH (pH de 5 à 7), le tampon Tris-HCl (pH de 8 à 9) et le tampon glycine-NaOH (pH 10) de manière à ce que la concentration soit de 26 μ /ml. On mesure l'activité résiduelle des solutions enzymatiques obtenues après traitement à 40°C pendant 60 minutes. Comme le montre la figure 2, la liqueur enzymatique est stable dans une gamme de pH allant de 6 à 9.

(5) Stabilité thermique.

On prépare une solution enzymatique de manière à ce que sa concentration dans un tampon de Tris-HCl 100 mM (pH 7,0) soit de 23 μ /ml et on mesure l'activité résiduelle, après l'avoir chauffée pendant 10 minutes à chaque température représentée en abscisses à la figure 3. La liqueur reste stable jusqu'au traitement à 40°C pendant 10 minutes.

(6) Effet d'ions métalliques.

	Additif	Activité relative (%)
	Pas d'addition	100
25	1 mM de $MgCl_2$	232
	" de $CaCl_2$	48
	" de $MnCl_2$	236
	" de $ZnCl_2$	3
	" de $NiCl_2$	12
30	" de $BaCl_2$	89
	" de $CoCl_2$	35
	" de $CuCl_2$	19
	100 mM de NaCl	73
	" de KCl	90
35	" de NH_4Cl	79

(7) Effet d'agent tensio-actif.

	Additif	Activité relative (%)
5	Pas d'addition	100
	0,1 % de Triton X-100	358
	" d'Adekato1 SO-145	367
	" d'Adekato1 PC-8	426
10	" d'Adekato1 L-61	267
	" de désoxycholate de sodium	16
	" de laurylsulfate de sodium	13
15	" de laurylbenzène sulfonate de sodium	8

20 (8) Masse moléculaire.

Elle est déterminée par le procédé d'électrophorèse dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide en utilisant l'enzyme purifié. La valeur obtenue est de 36.000.

25 (9) Point isoélectrique.

Il est déterminé par le procédé d'électrophorèse en utilisant comme support de l'ampholite. Le pH obtenu est de 8,6.

(10) Spécificité du substrat.

	Additif	Activité relative (%)
5	Sphingomyéline	100
	Léthicine	0
	Lysolécithine	0
	Phosphatidyléthanol-amine	0
10	Phosphatidylsérine	0
	Phosphatidylinositol	0

La figure 1 est un graphique représentant les résultats de la mesure du pH optimum de la sphingomyélinase obtenue par la présente invention. La figure 2 est un graphique représentant les résultats de la mesure de la stabilité du pH de la sphingomyélinase et la figure 3 est un graphique représentant les résultats de mesure de la stabilité thermique de la sphingomyélinase.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

EXEMPLE 1

On stérilise sous pression, à 120°C pendant 20 minutes, vingt litres d'un milieu (pH 7,0) comprenant, en poids, 1,0 % de protofroment, 2 % d'amidon de maïs, 0,3 % de KCl, 0,4 % de CaCO₃ et 0,1 % de Disfoam BC-51Y. Après avoir ajusté la température à 26°C, on transplante dans un fermenteur à agitation de 30 litres de capacité, 400 ml d'une solution de culture de Streptomyces sp. A 9107, cultivée au préalable pendant 3 jours, dans le milieu ayant la composition mentionnée ci-dessus. On effectue une culture sous aération et sous agitation à 300 tours par minute et à raison de 20 litres par minute, et 43 heures

après, le titrage enzymatique du mycélium atteint la valeur maximale (4,6 μ /ml). En enlevant le mycélium par centrifugation à 5000 tours par minute, pendant 10 minutes, on obtient 15 litres d'une solution brute de sphingomyélinase.

EXEMPLE 2

On concentre à 3 litres sous pression réduite, quinze litres de la solution enzymatique obtenue par le procédé illustré à l'exemple 1. On ajoute cinq litres d'acétone refroidie à -20°C à cette solution concentrée pour faire se déposer l'enzyme. On dissout ce précipité dans 1 litre de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), on dialyse jusqu'à obtenir 20 litres de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) et on lyophilise pour obtenir 8,4 grammes de poudre (3,8 μ /mg).

EXEMPLE 3

On dissout 2,0 grammes de la poudre obtenue par le procédé de l'exemple 2 dans 50 ml d'un tampon d'acétate 10 mM (pH 5,5) et on fait passer dans une colonne SP-Sephadex C-25 (1,8 x 20 cm) tamponnée par le même tampon pour absorber l'enzyme. Ensuite, on effectue l'élution par le procédé du gradient linéaire de concentration en utilisant 250 ml d'un tampon d'acétate 10 mM et 250 ml du tampon contenant du KCl 0,2 M (débit 20 ml/heure). On mesure l'activité de chaque fraction et on recueille les fractions ayant de l'activité (numéros 48 à 58, 95 ml), on les concentre par une membrane d'ultrafiltration XM-50 (fournie par la Société Amicon Co.), puis on les fait passer dans une colonne de Sephadex G-75 (3,0 x 90 cm, tampon au diméthylglutarate 10 mM). On recueille les fractions ayant de l'activité (numéros 21 à 28, 52 ml) et on les lyophilise pour obtenir 5,0 mg d'un enzyme purifié (masse volumique 1,050 μ /mg).

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation de sphingomyélinase, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver une bactérie produisant de la sphingomyélinase et appartenant
5 au genre Streptomyces, dans un milieu et à recueillir la sphingomyélinase obtenue dans le produit de culture.

2. Procédé de préparation suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la bactérie produisant de la sphingomyélinase appartenant au genre
10 Streptomyces est la souche Streptomyces sp. A 9107.

FIG. 1

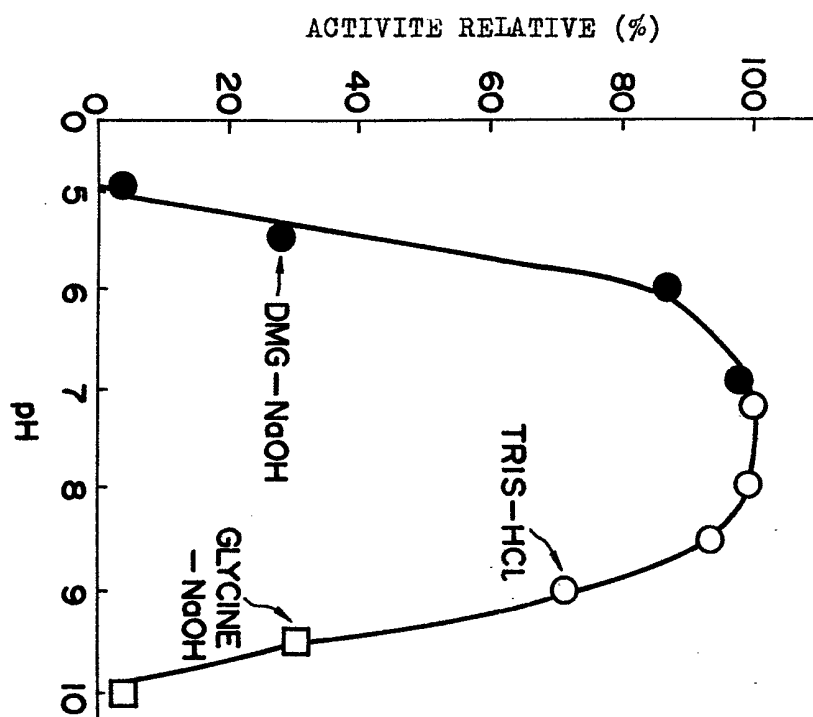


FIG. 2

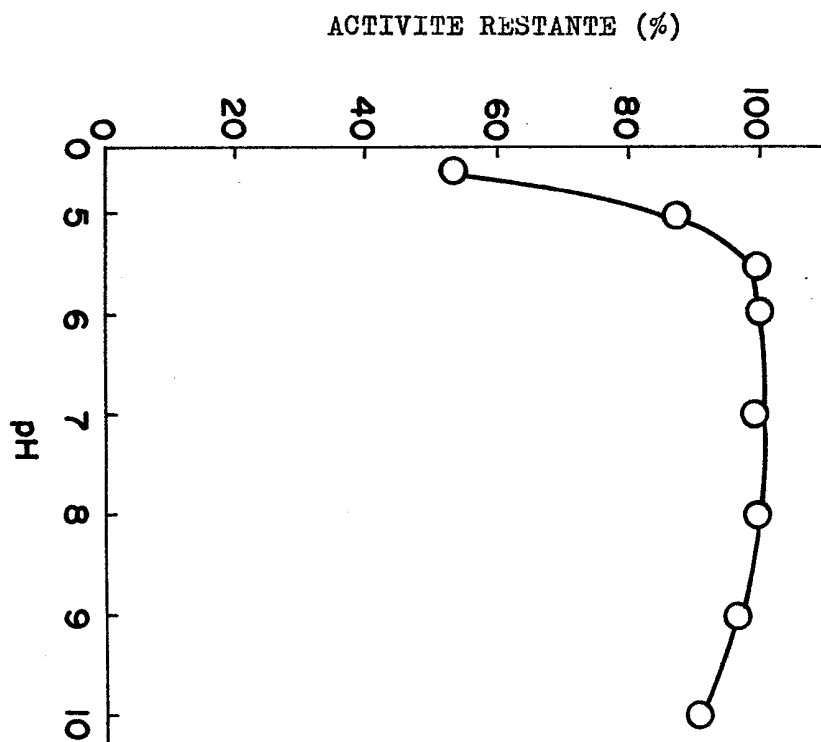


FIG. 3