



Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention :

Vu le procès-verbal dressé le 26 août 1980 à 14 h. 30
au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — *Il est délivré à la Sté dite : TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA,*
632-1, Mifuku, Ohito-cho, Tagata-gun, Shizuoka-ken,
(Japon),

repr. par les Bureaux Vander Haeghen à Bruxelles,

un brevet d'invention pour : Nouvelle glycérol kinase et sa production,

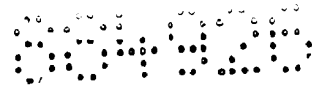
Article 2. — *Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.*

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 15 septembre 1980

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

L. SALPETEUR
Directeur



KP-5571
B. 73 941 DS

DESCRIPTION

jointe à une demande de

BREVET BELGE

déposée par la société dite:

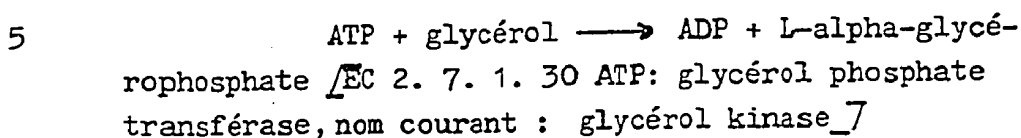
TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA

ayant pour objet: Nouvelle glycérol kinase et sa production

Qualification proposée: BREVET D'INVENTION

La présente invention concerne une nouvelle glycéról kinase et sa production.

La glycéról kinase est déjà connue comme étant une enzyme qui catalyse la réaction suivante:



10 La glycéról kinase déjà connue (on dési-
 gne ci-après la glycéról kinase par GK) est une enzyme
 produite par Candida mycoderma $\sqrt{\text{Biochem. Z., 329, 320}}$
 (1957), ibid., 333, 471 (1961) $\sqrt{\quad}$, une enzyme produite
 par Escherichia coli $\sqrt{\text{J.Biol. Chem. 242, 1030 (1967)}}$
 et une enzyme provenant du foie de pigeon $\sqrt{\text{Method in}}$
 Enzymology, Vol. 5, 476 (1962), Biochem. Z., 329, 320
 15 (1957), J. Biol. Chem., 211, 951 (1954)}}.

 On a trouvé qu'une souche de Streptomyces
 A 2408 isolée à partir d'un échantillon de terre d'un
 champ de soja de Kakegawa-shi, Shizuoka-ken, Japon,
 produit une enzyme qui catalyse une réaction avec le
 20 glycéról et ATP pour former ADP et du L-alpha-glycéró-
 rrophosphate dans ses cellules et qui, après purifica-
 tion, est électrophorétiquement homogène. Comme résultat,
 cette enzyme appartient au groupe GK, toutefois ses
 propriétés physico-chimiques et biochimiques sont
 25 inconnues jusqu'à présent et on l'a qualifiée de
 nouvelle enzyme GK.

 Les propriétés taxonomiques de la souche de
Streptomyces A 2408 sont les suivantes.

I. Propriétés morphologiques :

30 La couleur des hyphes aériens portant des
 spores mûres va d'un gris brunâtre à un brun grisâtre.
 Mycélium du substrat brun jaunâtre. Produit un pigment
 soluble brun jaunâtre.

 Les observations sur la gélose à l'ami-

don et aux substances inorganiques à 30°C pendant 10 jours sont illustrées comme suit. On observe les mêmes caractéristiques morphologiques sur de la gélose à la farine d'avoine et de la gélose glycérolée à l'asparagine.

Les hyphes aériens ont de 0,6 à 0,8 μ de diamètre, sont droits ou ondulés, se développant par ramification simple et forment de nombreuses chaînes de spores. Les chaînes de spores forment des spirales comportant 3 à 5 spires lâches, en forme de crochet, de boucle ou flexueuses.

Les spores sont de forme globuleuse ou ovale, 0,8 - 1,0 x 1,0 - 1,5 μ , surfaces avec des épines.

Les mycéliums de support sont ramifiés, se développant en hyphes ondulés ou flexueux de 0,5 - 0,6 μ de diamètre et ordinairement sans dédoublement des hyphes et port de spores.

Pas de formation de spores flagellaires ni de sporanges.

II. Composition de l'acide diaminopimérique :

On a détecté de l'acide L-diaminopimérique.

III. Caractéristiques sur divers milieux :

Des observations sur divers milieux à 30°C pendant 20 jours sont illustrées dans le Tableau 1.

[Les indications de couleurs sont basées sur "Color Harmony Manual", 4ème édition 1958 (Container Corp. of American, E.U.A)]7.

IV. Propriétés physiologiques :

- 1) Température de développement : 12-45°C
- 2) Liquéfaction de gélatine : positive
- 3) Hydrolyse de l'amidon : positive
- 4) Peptonisation du lait écrémé : positive; coagulation négative

5) Formation de pigment du genre mélanine :
négative

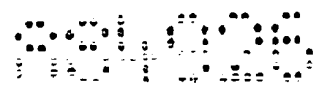
6) Utilisation de sources de carbone :
sont utilisés : L-arabinose, D-fructose,
5 D-glucose, i-inositol, D-mannitol, raffinose, L-rhamnose,
saccharose et D-xylose.

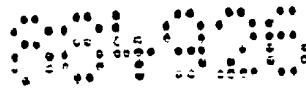
10 Comme illustré ci-dessus, la présente sou-
che de micro-organisme A 2408 appartient aux Strepto-
myces d'après les caractéristiques du mycélium aérien
ayant des chaînes de spores développées à partir du
véritable mycélium du substrat sans division, le diamè-
tre du mycélium, la grosseur des spores et le type L
de l'acide diaminopimélique. La souche A 2408 a les
15 caractéristiques suivantes : La couleur du mycélium
aérien est d'un gris brunâtre à un brun grisâtre. La
chaîne de spores est constituée de spirales lâches
de 3 à 5 spires. La surface des spores a des épines.
Le mycélium du substrat est d'un brun jaunâtre. Forma-
20 tion de pigment soluble brun jaunâtre. Large utilis-
ation de sucre. Pas de formation de pigment du genre
mélanine. Ces caractéristiques peuvent être détec-
tées pour Streptomyces canus (Heinemann et autres
[Antibiotics and Chemotherapy, 3, 1239 - 1242
91953] dans "International Streptomyces Project (ISP)"
25 [Inter. J. System. Bacteriol., 18 (2), 95 (1968)].
La comparaison entre la présente souche A 2408 et
Streptomyces canus ISP 5017 a montré la ressemblance
en ce qui concerne les propriétés morphologiques, cul-
turales et physiologiques.

30 En conséquence, la présente souche A 2408
est appelée Streptomyces canus A 2408. Cette souche a
été déposée à l'Institut pour l'Industrie et la
Technologie microbiennes au Japon comme collection per-
manente FERM-P N° 4977.

Tableau 1

Milieu	Développement	Couleur du mycélium du substrat	Mycélium aérien	Pigment soluble
Gélose avec sac- charose-nitrate	modéré à bon	brun doré (3 pl)	modéré à bon : bisque (3 ec)	néant
Gélose avec glucose-asparagine	modéré	brun moutarde (2 pl)	médicore à modéré naturel (3 dc) à bisque (3 ec)	néant
Gélose avso glycérol-asparagine	bon	brun girofle (3 pl) à brun doré (3 pl)	bon : beige (3 ge) à beige brun (3 ig)	néant
Gélose avec amidon-sel inorganique	bon	brun doré (3 pl) à brun girofle (3 pl)	bon : beige (3 ge) à gris argent (3 fe)	néant
Gélose à la tylosine	bon	brun doré (3 pl) à brun girofle (3 pl)	bon : beige (3 ge) à brun beige (3 ig) léger pâle (4 ng)	néant à brun léger pâle (4 ng)
Gélose à la farine d'avoine	bon	brun doré (3 pl)	bon : beige (3 ge) à brun beige (3 ig)	néant
Gélose avec extrait de levures-extrait de malt	bon	brun doré (3 pl)	bon : naturel (3 dc) à gris argent (3 fe)	néant
Gélose glycérolée et nitratée	bon	brun girofle (3 pl)	bon : naturel (3 dc) à beige (3 ge)	brun girofle (3 pl)
Gélose avec glycérol- amidon-glutamate	bon	brun girofle (3 pl)	bon : beige (3 ge) à tan voilé (2 ge)	à brun girofle (3 pl)
Gélose de Benett	bon	brun doré (3 pl)	bon : naturel (3 dc) à gris argent (3 fe)	néant
Gélose d'Emerson	modéré	or moutarde (2 ps)	petite quantité : blanc (a)	néant
Gélose nutritive	médicore à faible	incoloro à blé clair (2 ea)	Néant	néant





On a trouvé que la GK produite par Streptomyces canus A 2408 était une enzyme nouvelle ayant les propriétés physicochimiques et biologiques illustrées ci-après.

5 On peut utiliser GK comme réactif de recherche ou réactif de diagnostic pour le métabolisme de triglycérides dans des liquides du corps comme le sérum.

10 Un but de la présente invention est de fournir une nouvelle GK et un procédé pour sa production.

15 Un micro-organisme utilisé dans la présente invention peut être mentionné, par exemple Streptomyces illustré ci-dessus, mais ce n'est pas limitatif et on peut utiliser le présent micro-organisme producteur de GK et ses souches mutantes.

20 On peut produire la nouvelle GK en cultivant un micro-organisme producteur de GK tel qu'une souche productrice de GK appartenant au genre Streptomyces dans un milieu classique pour la production d'enzymes. La culture est habituellement une culture en milieu liquide et une culture immergée avec aération est avantageuse pour une production industrielle.

25 On peut utiliser un milieu nutritif classique pour micro-organismes. En ce qui concerne les sources de carbone, on peut utiliser avantageusement une source de carbone assimilable, spécialement du glycérol. On peut aussi utiliser d'autres sources de carbone comme du glucose, du saccharose, du lactose,
30 de l'amidon, de la mélasse. En ce qui concerne les sources d'azote, on peut utiliser une source d'azote assimilable comme de la liqueur de macération de maïs, de la poudre de soja, de la poudre de graines de coton, de la levure sèche, de l'hydrolysate de
35 caséine, de l'extrait de levures, de l'extrait de



farine de poisson et de la peptone. On peut utiliser, si nécessaire, un phosphate, un sulfate et un sel inorganique de magnésium, de calcium, de potassium, de fer, de manganèse ou de zinc.

5 La température de culture peut être choisie dans l'intervalle convenable pour le développement des micro-organismes et la production de GK et est de préférence de 25-30°C. La durée pendant laquelle on conduit la culture dépend des conditions et elle
10 doit être arrêtée à la production maximale de GK, habituellement après 1 à 3 jours.

La présente enzyme peut être isolée à partir du mycélium. On centrifuge le bouillon de culture pour recueillir le mycélium qu'on soumet à
15 une sonication, puis à une centrifugation pour recueillir la solution surnageante. On traite cette solution par relargage en utilisant par exemple du sulfate d'ammonium (appelé ci-après AS) ou du sulfate de sodium pour séparer les impuretés. On soumet ensuite le liquide surnageant à un relargage et
20 on effectue une centrifugation pour obtenir le précipité contenant GK. La GK précipitée est ensuite purifiée par relargage avec Sephadex G-25 (nom commercial, Pharmacia Co.), Biogel P-2 (nom commercial, Biorad Corp.), par dialyse à travers une membrane ou
25 au moyen de fibres creuses et traitée par échange d'ions comme en utilisant de la DEAE-cellulose. La fraction de GK ainsi obtenue est relarguée et concentrée au moyen d'une membrane d'ultrafiltration comme
30 l'Amicon XM-50 (nom commercial, Amicon Co.). La fraction relarguée est soumise à une chromatographie d'absorption comme en utilisant une colonne de gel de phosphate de calcium pour séparation des impuretés et en effectuant ensuite une élution à gradient au
35 moyen d'un tampon phosphate. La fraction contenant

GK est relarguée et concentrée à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration comme l'Amicon XM-50. On soumet le concentré à une chromatographie par filtration à travers un gel en utilisant par exemple Biogel P-200 (Biorad Co.) ou Sephadex G-150 (Pharmacie Co.), puis la fraction de GK est lyophilisée.

La GK obtenue par la technique de purification ci-dessus a les propriétés physico-chimiques et biochimiques suivantes.

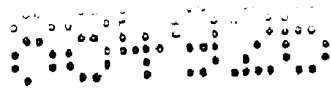
10	(A) Titrage de l'enzyme :	
	tampon 0,2 M tris-HCl (pH 9,0)	0,4 cm ³
	0,1 M glycérol	0,05 cm ³
	10 mM ATP	0,1 cm ³
	10 mM MgCl ₂	0,1 cm ³
15	0,25% bleu de nitrotétrazolium	0,1 cm ³
	1% sérum d'albumine de boeuf	0,14 cm ³
	10 mM NAD	0,1 cm ³
	0,05% méthosulfate de phénazine	0,01 cm ³
20	glycérophosphate déshydrogénase (Boehringer Co., 2 mg/cm ³ , 65 U/mg)	5 μl

On met le mélange ci-dessus (1 cm³) en pré-incubation à 37°C pendant 5 minutes, on y ajoute une solution de GK (50 ul) diluée avec du tampon GL (tampon phosphate 10 mM contenant du glycérol 10 mM, pH 7,5) et on met à incuber à 37°C pendant 10 minutes. On arrête la réaction en ajoutant 0,1 N HCl et on opère à 550 nm pour mesurer le pouvoir absorbant (A_{550 nm}).

Une unité de GK est définie par la libération de 1 mole de glycéro-3-phosphate par minute.

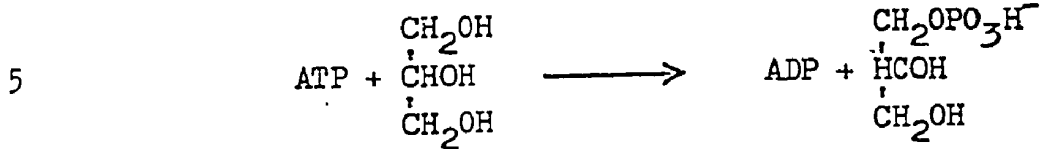
30 On calcule l'activité enzymatique comme suit :

$$\begin{aligned} \text{Activité enzymatique (U/cm}^3\text{)} &= \frac{\Delta A \times \text{rapport de dilution}}{0,05 \times 10} \times \frac{1}{4} \\ &= \frac{\Delta A}{2} \times \text{rapport de dilution} \end{aligned}$$



(B) Propriétés physico-chimiques et biochimiques :

Action de l'enzyme : catalyse au moins la réaction suivante



Masse moléculaire : 72000 ± 7200

72000 : mesurée sur Sephadex G-100

65000 : mesurée sur SDS polyacrylamide

10 Point iso-électrique : 4,5

Valeur de Km :

glycérol	: 4,8 × 10 ⁻⁵ M
dihydroxy-acétone	: 6,6 × 10 ⁻⁴ M
D-glycéraldéhyde	: 3,5 × 10 ⁻⁴ M
ATP	: 2 × 10 ⁻⁴ M

15 Spécificité concernant le substrat :

(1) spécificité pour le glycérol, le phosphate de dihydroxy-acétone et le D-glycéraldéhyde : (méthode d'essai)

Mélange réactionnel :

20 0,2 M tampon tris-HCl (pH 9,0)	0,4 cm ³
0,1 M glycérol, phosphate de dihydroxy-acétone ou D-glycéraldéhyde	0,05 cm ³
10 mM ATP	0,1 cm ³
10 mM MgCl ₂	0,1 cm ³
25 eau distillée	0,3 cm ³

On met le mélange réactionnel (0,95 cm³) en pré-incubation à 37°C pendant 3 minutes et on y ajoute la solution d'enzyme (dissoute dans du tampon phosphate 10 mM, pH 7,5, 0,05 cm³), puis on fait incuber le mélange à 37°C pendant 10 minutes. On arrête la réaction par ébullition pendant 3 minutes. Après refroidissement à 37°C, on détermine la quantité d'ADP. On détermine ADP en ajoutant une solution de titrage d'ADP (2,0 cm³) comprenant le mélange suivant :

35

	0,1 M tampon phosphate (pH 7,5)	0,1 cm ³
	0,2 M tampon diméthylglutarate-NaOH (pH 7,5)	0,1 cm ³
	peroxydase (0,5 g/cm ³)	0,1 cm ³
5	0,2% phénol	0,1 cm ³
	0,3% 4-amino-antipyrine	0,1 cm ³
	10 mM MnCl ₂	0,05 cm ³
	10 mM pyrophosphate de thiamine	0,03 cm ³
	1 mM FAD	0,01 cm ³
10	10 mM phosphoénolpyruvate	0,1 cm ³
	pyruvate oxydase (100 U/cm ³ ; Toyo Jozo Co.)	0,05 cm ³
	pyruvate kinase (4400 U/cm ³ ; Sigma Chem. Co.)	1 µl
	eau distillée	1,26 cm ³

15 On fait incuber le mélange réactionnel à 37°C pendant 15 minutes. La couleur formée est mesurée à 550 nm pour calcul de la spécificité envers le substrat.

	<u>Substrat :</u>	<u>Activité relative</u>
20	glycérol	100%
	dihydroxy-acétone	74%
	D-glycéraldéhyde	20%

(2) activité spécifique pour les nucléotides :
ATP > CTP > ITP >> GTP, UTP

25 (Méthode d'essai)

Dans la méthode d'essai (1) ci-dessus, on remplace 10 mM ATP par CTP, ITP, GTP et UTP et on mesure le glycéro-3-phosphate formé. Comme illustré ci-après, tous les nucléotides essayés peuvent être un substrat; on a observé une spécificité particulièrement élevée pour ATP et CTP.

30

Substrat	Activité relative (%)
ATP	100
CTP	92
ITP	47
5 GTP	19
UTP	18

pH optimal : pH 9 - 10, comme représenté sur la figure 1.

10 [Sur la figure, o_o : tampon diméthylglutarate-NaOH (pH 6 - 7,5), -.-: tampon tris-HCl (pH 7 - 9), A-Δ : tampon phosphate (pH 6 - 8), ▲-▲: tampon glycocole-NaOH (pH 9 - 10,5)]

Stabilité au pH : pH 5,5 - 10 comme représenté sur la figure 2.

15 On utilise un tampon diméthylglutarate (pH 4 - 7) et un tampon glycocole-NaOH (pH 10 - 10,5) contenant chacun 10 mM glycérol. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 60 minutes.

Effet d'ions de métaux et du p-chloromercuribenzoate (PCMB):

20

Réactif	Concentration	Activité relative (%)	
		sans Mg ⁺⁺	avec 1 mM Mg ⁺⁺
néant	-	5	100
MgCl ₂	1,0 mM	100	100
25 CaCl ₂	1,0 mM	0	54
MnCl ₂	1,0 mM	6	14
PCMB	5,0 x 10 ⁻⁶ M	-	13
"	7,5 x 10 ⁻⁶ M	-	0

30 La GK de la présente invention est activée par Mg⁺⁺ et inhibée par Ca⁺⁺ et Mn⁺⁺. L'activité de la présente GK est complètement inhibée par 7,5 x 10⁻⁶ M de PCMB.

Stabilité à la chaleur : stable jusqu'à 45°C comme représenté sur la figure 3.

35 Titration : tampon 10 mM phosphate (pH 7,8)



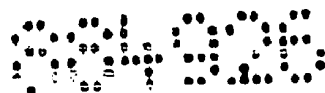
contenant 10 mM glycérol. Incubation à 45 - 75 C pendant 10 minutes chaque fois.

5 Comme illustré ci-dessus, l'enzyme selon la présente invention appartient à un groupe d'enzymes catalysant une réaction : glycérol + ATP \longrightarrow ADP + L-alpha-glycérate.

10 La comparaison de glycérol kinases connues, la GK de Candida mycoderma (appelée ci-après C.My.-GK), la GK d'Escherichia coli (appelée ci-après Fig.-GK ou E.co-GK) avec la GK selon la présente invention est la suivante.

15 La masse moléculaire de E.co-GK est de 300 000 et celle de C.My.-GK est de 250 000 (tétramère de la masse moléculaire de 60 000), tandis que la GK selon la présente invention est un monomère d'une masse moléculaire de 70 000 environ. La stabilité au pH est : pH 6,5 - 7 pour E.co-GK, pH 4,5 - 5,5 pour Fig.-GK et pH 6,7 pour C.My.-GK, au lieu de pH 5,5 - 10 pour la présente GK. Comme la réaction exigeant ATP exige un ion de métal divalent, la GK ci-dessus exige aussi 20 Mg⁺⁺, toutefois Mn⁺⁺ peut y être substitué pour E.co-GK et Fig.-GK, tandis que Mn⁺⁺ inhibe fortement la présente GK.

25 De plus, les spécificités concernant les substrats sont différentes pour chaque GK. E.co-GK présente une activité presque deux fois plus forte pour le phosphate de dihydroxy-acétone que pour le glycérol, tandis que la présente GK fait montre d'une plus haute spécificité pour le glycérol que pour le phosphate de dihydroxy-acétone. E.co-GK 30 agit seulement pour ATP, et la présente GK agit pour ATP et CTP et aussi pour ITP, GTP et UTP. Comme résultat, la masse moléculaire, la stabilité au pH, l'exigence en ion de métal divalent et la spécificité envers le substrat prouvent que la présente 35 glycérol kinase est une nouvelle GK.



La GK selon la présente invention peut être utilisée comme enzyme pour diagnostic.

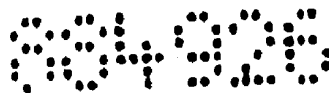
5 Par exemple, on peut utiliser la présente GK pour titrage des triglycérides et du glycérol en faisant réagir les triglycérides et de la lipoprotéi- nelipase, en faisant incuber le mélange de réaction avec GK et ATP de manière à former du glycéro-3- phosphate que l'on fait incuber ensuite avec de la glycéro-3-phosphate oxydase, puis on mesure l'oxygène
10 consommé ou l'eau oxygénée libérée.

L'exemple suivant illustre la présente invention, mais ne doit pas être considéré comme la limitant.

Exemple

15 Un milieu (100 cm³) (pH 7,0) constitué de peptone 1,0%, glycérol 1,5%, K₂HPO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,05% et KCl 0,20% dans un erlenmeyer de 500 cm³ est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes. On y inocu- le Streptomyces canus A 24-8 (FERM-P N° 4977) et on cul-
20 tive à 26°C pendant 3 jours. Le bouillon obtenu est inoculé dans un fermenteur cylindrique de 30 litres contenant le même milieu (20 litres) et on conduit la culture dans des conditions aérobies à 26°C pendant 40 heures, 300 tpm, aération 20 litres par minute.
25 Deux litres du bouillon obtenu sont centrifugés (15 000 tpm, pendant 10 minutes) à 4°C pour recueil du mycélium. On met le mycélium en suspension dans du tampon GL (800 cm³) et on le soumet à une sonica- tion à 0°C pendant 5 minutes à l'aide d'un appareil
30 à ultrasons (KUBOTA INSONATOR 200M, nom commercial).

On centrifuge la solution à 4°C pendant 10 minutes à 15 000 tpm pour obtenir un liquide sur- nageant (760 cm³). Après addition d'une solution à 5% de protamine (23,0 cm³), on précipite les im-
35 puretés par centrifugation à 4°C, 5000 tpm pendant



10 minutes. On ajoute une solution saturée de sulfate d'ammonium (pH 7,5, 1125 cm³) au liquide surnageant (750 cm³) et on centrifuge à 4°C, 15 000 tpm pendant 10 minutes pour recueillir le précipité. On ajoute
5 une quantité supplémentaire de solution saturée de sulfate d'ammonium (pH 7,5, 37,2 cm³) à la solution du précipité dans 62 cm³ de tampon GL pour précipiter les impuretés. Le liquide surnageant (82 cm³) est obtenu par centrifugation à 4°C, 15 000 tpm pendant
10 10 minutes, puis on ajoute une solution saturée de sulfate d'ammonium (pH 7,5, 20,5 cm³). Une centrifugation supplémentaire à 4°C, 15 000 tpm pendant 10 minutes donne un précipité.

On dissout le précipité dans du tampon GL
15 (11,0 cm³) et on charge la solution sur une colonne de Sephadex G-25 (3 x 30 cm³) remplie du même tampon, puis on élue avec le même tampon à 25°C, débit 40 cm³/h. On recueille les fractions présentant une absorption à 280 nm (environ 21 cm³). On charge ces
20 fractions sur une colonne de DEAE-cellulose (2,2 x 17 cm) remplie de tampon GL, on lave avec du tampon GL (80 cm³) (débit 25 cm³/h, 5,8 cm³ par fraction), ensuite on élue les impuretés avec du tampon GL contenant 0,1 M KCl (débit 25 cm³/heure, 5,8 cm³ par frac-
25 tion). On recueille les fractions actives N° 63 à 79 par élution à gradient linéaire avec un tampon GL contenant 200 cm³ de 0,1 M KCl et un tampon GL contenant 200 cm³ de 0,4 M KCl (débit 25 cm³/h, chaque fraction 5,8 cm³). Un éluat actif combiné (98 cm³)
30 est relargué et concentré sur Amicon XM-50 à 4°C pendant 4 heures pour donner la solution concentrée (10 cm³). On charge le concentré sur une colonne de gel de phosphate de calcium (2,0 x 17,2 cm) rem-
35 plie de tampon GL, on lave avec du tampon GL (100 cm³) et on élue par un gradient linéaire de 200 cm³ de tam-



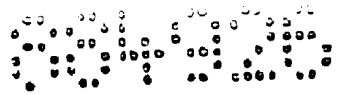
pon GL à 100 mM de tampon phosphate contenant 200 cm³
de 100 mM glycérol (débit 25 cm³/h, 6 cm³ par fraction).
On recueille les fractions actives N° 48 à 58 et la
solution combinée est concentrée par Amicon X-50 pour
5 donner un concentré (2 cm³). On charge ce concentré
sur une colonne de Biogel P-200 (3 x 60 cm) remplie
de tampon GL, on élue avec le même tampon (débit
25 cm³/h, 6 cm³ par fraction) et on recueille les
10 fractions actives N° 17 à 20, qui sont combinées et
lyophilisées pour donner la GK purifiée (activité
spécifique 57,6 U/mg, 16,9 mg de protéine).

Explication simple des dessins :

Figure 1 : Courbe de pH optimal de la
15 présente GK.

Figure 2 : Courbe de stabilité au pH
de la présente GK.

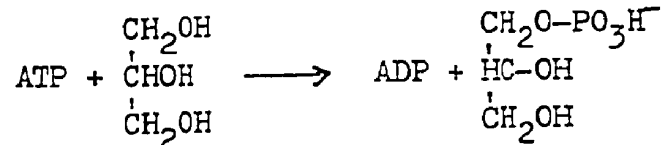
Figure 3 : Courbe de stabilité à la
chaieur de la présente GK.



REVENDEICATIONS

1) Nouvelle glycérol kinase ayant les propriétés suivantes :

5 (1) action enzymatique : catalyse au moins la réaction suivante :

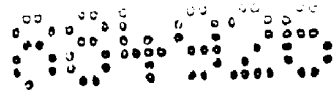


- 10 (2) masse moléculaire : 72 000 \pm 7 200
- (3) point iso-électrique : 4,5
- (4) valeur de Km : glycérol 4,8 x 10⁻⁵ M
dihydroxy-acétone 6,6 x 10⁻⁴ M
D-glycéraldéhyde 3,5 x 10⁻⁴ M
ATP 2 x 10⁻⁴ M
- 15 (5) spécificités pour les nucléotides :
ATP > CTP > ITP \gg GTP, UTP
- (6) pH optimal : pH 9 - 10
- (7) stabilité au pH : pH 5,5 - 10
- (8) effet des ions de métaux : stimulation
20 par Mg⁺⁺ inhibition
par Ca⁺⁺ et Mn⁺⁺
- (9) stabilité à la chaleur : stable jusqu'à 45 .

2) Procédé pour la production de glycérol kinase caractérisé en ce qu'on cultive un micro-organisme producteur de glycérol kinase dans un milieu nutritif
25 contenant des sources de carbone et d'azote et un sel inorganique, de manière à isoler la glycérol kinase ainsi produite.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le micro-organisme producteur de glycérol kinase est un micro-organisme producteur de glycérol kinase appartenant au genre Streptomyces.

30



- 4) Procédé selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisé en ce que le micro-organisme producteur de glycérol kinase est Streptomyces canus A 2408.
- 5) Procédé selon l'une des revendications 2, 3 et 4, caractérisé en ce qu'une source de carbone est du glycérol.

BRUXELLES, le 26 AOUT 1980

P. Pon

Kays Joo
Kallshiki Kaisha

P. Pon BUREAU VANDER HAEGHEN

[Signature]

FIG. 1

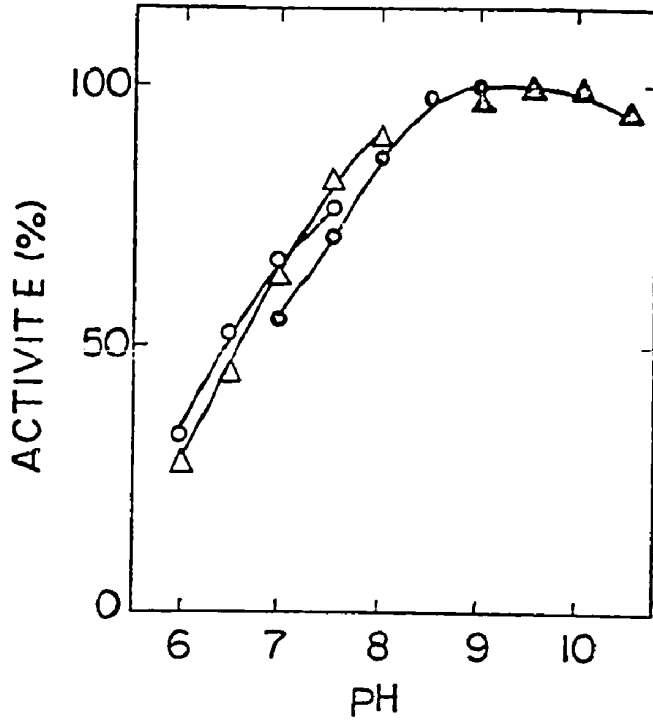
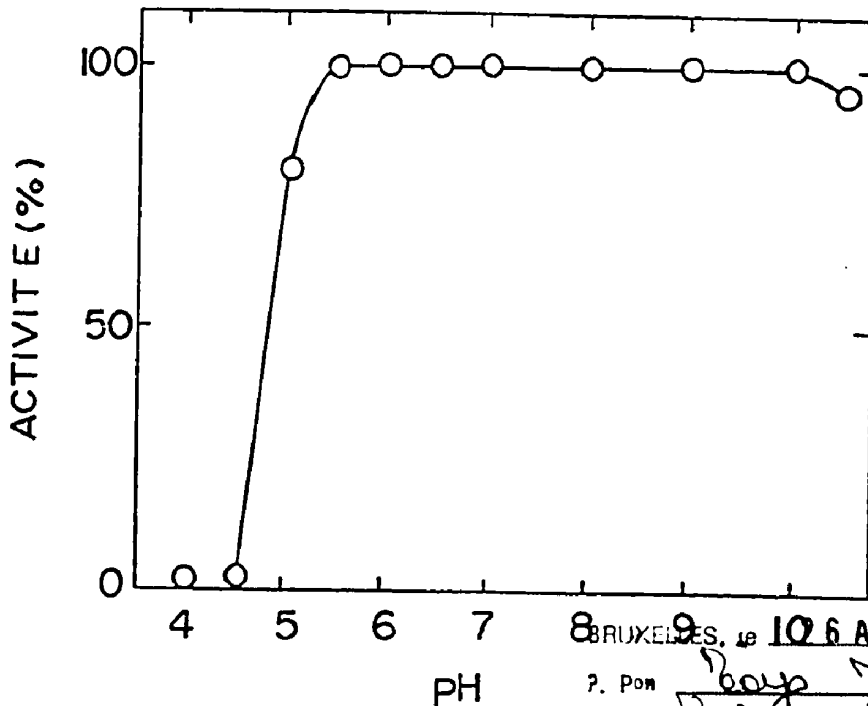


FIG. 2



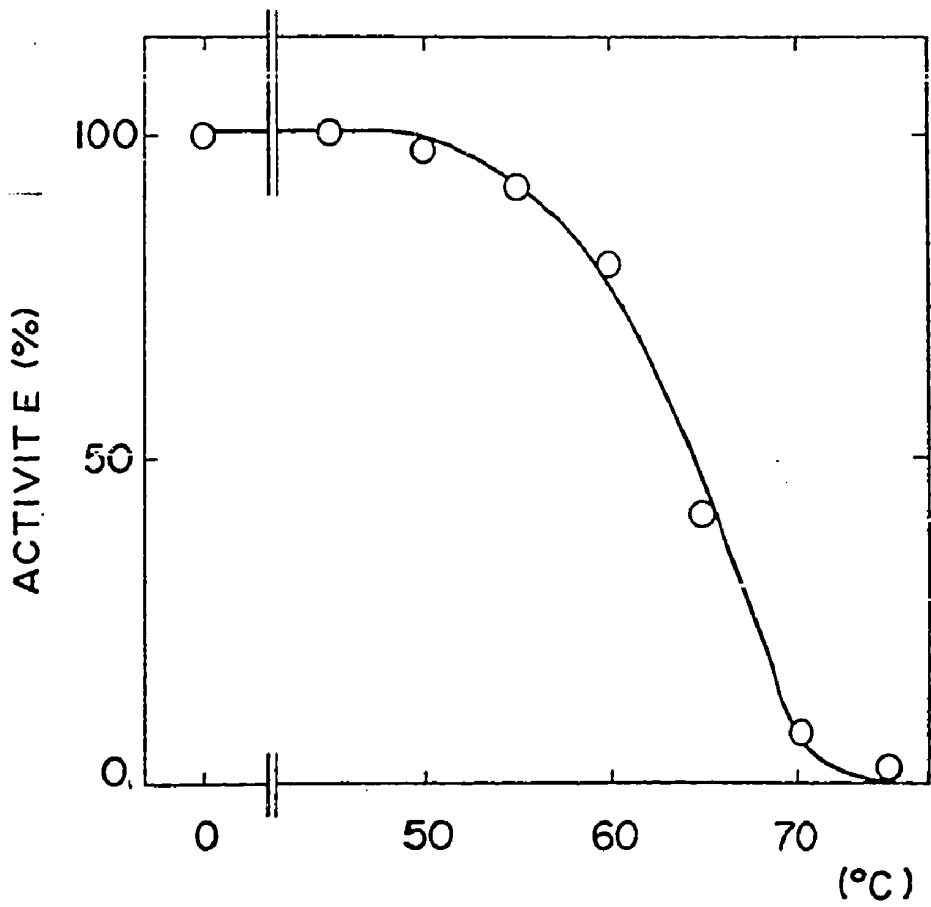
BRUXELLES, le 10.6 AOUT 1980

P. POU

Boys Jozo Ralushiki Raisha

[Signature]
P. POU BIRFAR AND/OR HAEGHEW

FIG. 3



BRUXELLES, le ~~26 AOUT 1960~~

P. Pon Boya Jyo
Koshiki Kaisha

P. Pon BUREAU VANDER HAEGHEN