



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8003236**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Glycerolkinase en de bereiding daarvan.**
- ⑤1 Int.Cl³: C12N9/12// C12R1/465.
- ⑦1 Aanvrager: Toyo Jozo Kabushiki Kaisha te Tagata, Japan.
- ⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

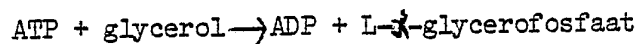
-
- ②1 Aanvraag Nr. 8003236.
- ②2 Ingediend 3 juni 1980.
- ③2 Voorrang vanaf 6 juni 1979.
- ③3 Land van voorrang: Japan (JP).
- ③1 Nummer van de voorrangs-aanvraag: 71459/79 .
- ②3 --
- ⑥1 --
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 9 december 1980.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Titel: Glycerolkinase en de bereiding daarvan.

De uitvinding betreft een nieuwe glycerolkinase en de bereiding daarvan. Glycerolkinase is tot dusver bekend als een enzym dat de volgende reactie katalyseert:



- 5 (EC 2.7.1.30 ATP : glycerolfosfaat-transferase, of te wel glycerolkinase).

Tot dusver werd glycerolkinase (GK) gevonden in Candida mycoderma (Biochem. Z., 329, 320 (1957), ibid. 333, 471 (1961), Escherichia coli (J. Biol. Chem. 242, 1030 (1967) en duivenlever (Method in Enzymology, 10 5, 476 (1962), Biochem. Z., 329, 320 (1957), en J. Biol. Chem., 211, 951 (1954)).

Er werd nu gevonden, dat een Streptomyces-stam A 2408, geïsoleerd uit een sojavelde in Kakegawa-shi, Shizuoka-ken, Japan, een enzym, , dat een reactie met glycerol en ATP tot ADP en L- α -glycerol-
15 fosfaat katalyseert, in zijn mycelium produceert, en dit enzym is elektroforetisch gezuiverd tot een enkel enzym. Dit enzym behoort tot de GK-groep, hoewel zijn fysicochemische en biochemische eigenschappen tot dusver onbekend waren, zodat het een nieuw GK is.

De taxonomische kenmerken van de genoemde Streptomyces-stam A 2408
20 luiden als volgt:

I. Morfologische eigenschappen:

De kleur van de rijpe sporendragende luchthyfen zijn bruinachtig grijs tot grijsachtig bruin. Het substraat-mycelium is geelachtig bruin. Geproduceerd wordt een geelachtig bruin oplosbaar pigment. Waarnemingen
25 op zetmeel-anorganische agar gedurende 10 dagen bij 30°C luiden als hieronder weergegeven. Dezelfde morfologische kenmerken werden waargenomen op havermeel-agar en glycerol-asparagine-agar.

De luchthyfen zijn 0,6-0,8 μ in diameter, recht of vervlecht, eventueel vertakt en vormen vele sporenketens. Deze sporenketens vormen
30 spiralen met 3-5 losse windingen, in de vorm van haken, lussen of gebogen.

De vorm van de sporen is rond tot ovaal, 0,8-1,0 x 1,0x1,5 μ ; oppervlak met stekels.

De substraatmyceliën zijn vertakt, vervlecht of gebogen,
35 0,5-0,6 μ in diameter, waarbij de hyfen nauwelijks zijn geplitst, en

dragen sporen. Flagellaire sporen en sporangiën zijn niet waargenomen.

II. Diaminopimerinezuur werd niet waargenomen.

III. Eigenschappen op diverse media:

De kenmerken op diverse media bij 20 dagen groeien bij 30°C zijn
5 weergegeven in tabel A.

IV. Fysiologische eigenschappen:

- 1) Groeitemperatuur 12-45°C,
- 2) vervloeiing van gelatine: positief,
- 3) zetmeelhydrolyse: positief,
- 10 4) mager melk: peptonisatie; positief, coagulatie; negatief,
- 5) vorming van melamineachtig pigment: negatief,
- 6) verbruik van koolstofbronnen:

verbruikt: L-arabinose, D-fructose, D-glucose, i-inositol,
D-mannitol, raffinose, L-rhamnose, saccharose en
15 D-xylose.

Als gezegd behoort de stam A 2408 tot het geslacht Streptomyces
vanwege het luchtmycelium met sporenketen afkomstig van onverdeeld
echt substraat-mycelium, de diameter van het mycelium en de sporen-
grootte en het L-diaminopimelinezuur. De stam A 2408 heeft de volgende
20 kenmerken: kleur van het luchtmycelium is bruinachtig grijs tot grijs-
achtig bruin, sporenketens losse spiralen met 3-5 windingen. Het opper-
vlak van de sporen heeft stekels. Kleur van het substraatmycelium is
geelachtig bruin; er wordt geelachtig bruin oplosbaar pigment gevormd.
Een vrij groot aantal suiker wordt verbruikt. Er wordt geen melanine-
25 achtig pigment gevormd. Deze kenmerken zijn karakteristiek voor
Streptomyces canus (Antibiotics and Chemotherapy, 3, 1239-1242).
Vergelijkt men de stam A 2409 met Streptomyces canus ISP 5017, dan
ziet men een duidelijke overeenkomst in morfologische, groei en fy-
siologische eigenschappen.

30 De onderhavige stam A 2408 wordt daarom aangeduid als
Streptomyces canus A 2408. Deze stam werd gedeponeerd bij het Institute
for Microbial Industry and Technology, te Japan in de permanente collec-
tie FERM-P No. 4977.

35

Tabel A

Medium	groei	kleur substraat mycelium	lucht mycelium	oplosb. pigment
saccharose-nitraat agar	matig tot goed	goudbruin (3 pi)	matig tot goed (bisque (3 ec)	geen
glucose-asparagine agar	matig	mosterdbruin (2 pi)	gering tot matig natuurlijk (3 dc) tot bisque (3 ec)	geen
glycerol-asparagine agar	goed	kruidnagelbruin (3 pl) tot goudbruin (3 pi)	goed: beige (3 ge) tot beigebruin (3 ig)	geen
zetmeel-anorganisch zout agar	goed	goudbruin (3 pi) tot kruidnagelbruin (3 pl)	goed: beige (3 ge) tot zilvergrijs (3 fe)	geen
tyrosine agar	goed	goudbruin (3 pi) tot kruidnagelbruin (3 pl)	goed: beide (3 ge) tot beigebruin (3 ig)	geen tot lichtbruin (4 ng)
havermeel agar	goed	goudbruin (3 pi)	goed: beige (3 ge) tot beigebruin (3 ig)	geen
pistextract-moutextract agar	goed	goudbruin (3 pi)	goed: naturel (3 dc) tot zilvergrijs (3 fe)	geen
glycerolnitraat agar	goed	kruidnagelbruin (3 pl)	goed: naturel (3 dc) tot beige (3 ge)	kruidnagelbruin (3)
glycerol-zetmeel-glutamaat agar	goed	kruidnagelbruin (3 pl)	goed: beige (3 ge) tot tankleurig (2 ge)	kruidnagelbruin (3 pl)
Benettagar	goed	goudbruin (3 pi)	goed: naturel (3 dc) tot zilvergrijs (3 fe)	geen
Emerson-agar	matig	mosterdgoud (2 pe)	gering: wit (a)	geen
voedingsagar	vrij gering	kleurloos tot licht korenkleurig (2 ea)	geen	geen

800 32 36

Gevonden werd, dat GK, geproduceerd door Streptomyces canus A 2408 een nieuw enzym is met de onderstaande fysicochemische en biochemische eigenschappen.

5 GK kan worden gebruikt als researchreagens of diagnostisch reagens om het metabolisme van triglyceriden in lichaamsvloeistoffen als serum na te gaan.

Het toe te passen organisme kan worden aangeduid als Streptomyces maar is niet beperkt tot deze organismen omdat ook andere organismen en mutanten kunnen worden gebruikt.

10 Het nieuwe GK kan worden verkregen door het kweken van een GK-producerend organisme, zoals een GK-producerende stam behorende tot het geslacht Streptomyces en wel in een gebruikelijk medium. Liefst wordt onder submerse voorwaarden en beluchting gekweekt.

15 Een gebruikelijke voedingsbodem voor microorganismen kan worden gebruikt. Als koolstofbronnen worden assimileerbare koolstofbronnen gebruikt, liefst glycerol. Andere koolstofbronnen, zoals glucose, saccharose, lactose en zetmeelmelasse kunnen eveneens worden toegepast. Als stikstofbronnen komen assimileerbare stikstofbronnen in aanmerking, zoals maisweekwater, sojapoeder, katoenzaadpoeder, droge gist, caseïnehydrolysaten, 20 gistextracten, vismeleextracten en pepton. Fosfaat, sulfaat en anorganische zouten van magnesium, calcium, kalium, ijzer, mangaan of zink kunnen eveneens worden toegepast.

Gekweekt wordt bij een temperatuur van liefst 25-30°C, terwijl een maximale productie van GK na meestal 1-3 dagen wordt bereikt.

25 Het onderhavige enzym kan uit de myceliën worden geïsoleerd. Daartoe wordt de gefermenteerde vloeistof gecentrifugeerd en de mycelia geïsoleerd, welke vervolgens ultrasoon worden behandeld, waarna opnieuw wordt gecentrifugeerd om de bovenstaande vloeistof te winnen. De laatste vloeistof wordt uitgezouten met b.v. ammoniumsulfaat (AS) of natrium- 30 sulfaat om onzuiverheden af te scheiden. Vervolgens wordt de vloeistof opnieuw uitgezouten, en gecentrifugeerd om een GK-houdend neerslag te winnen. Dit neergeslagen GK wordt verder gezuiverd door te ontzouten met Sephadex-G-25, Biogel P-2, een dialyserend membraan of holle-vezels, en behandeld met een ionenuitwisselende chromatografiekolom, b.v. van 35 DEAE-cellulose. De aldus verkregen GK-fractie wordt ontzout en geconcen-

treerd door een ultrafiltratiemembraan, zoals Amicon XM-50. De ontzoute fractie wordt vervolgens met calciumfosfaatgelkolommen adsorberend ge-

chromatografeerd om de onzuiverheden af te scheiden, waarna met een fosfaatbuffer-gradiënt wordt geëluëerd. De GK-houdende fractie wordt
5 ontzout en geconcentreerd door een ultrafiltratiemembraan als Amicon XM-50. Het genoemde concentraat wordt aan gelfiltratiechromatografie onderworpen onder toepassing van Biogel P-200 of Sephadex G-150, waarna de GK-fractie wordt gelyofiliseerd.

Het aldus verkregen GK heeft de volgende fysicochemische en
10 biochemische eigenschappen.

(A) Enzymanalyse:

	0,2 M tris-HCl buffer (pH 9,0)	0,4 ml
	0,1 M glycerol	0,05 ml
	10 mM ATP	0,1 ml
15	10 mM MgCl ₂	0,1 ml
	0,25% nitrotetrazolium blauw	0,1 ml
	1% rundergerum-albumine	0,14 ml
	10 mM NAD	0,1 ml
	0,05% fenazinemethosulfaat	0,01 ml
20	glycerofosfaat-dehydrogenase (Boehringer Co., 2 mg/ml, 65 E/mg)	5 µl

1 cm³ van dit mengsel wordt 5 minuten bij 37°C gepreïncubeerd en 50 µl van een GK-oplossing (verdund met GL-buffer, 10 mM fosfaatbuffer met daarin 10 mM glycerol van pH 7,5) daaraan toegevoegd en
25 10 minuten bij 37°C geïncubeerd. De reactie wordt beëindigd door toevoeging van 0,1 N zoutzuur en bij 550 nm de absorptie A₅₅₀ gemeten.

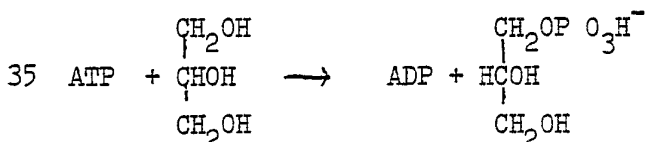
Eén eenheid GK wordt gedefinieerd door de vrijstelling van 1 mol glycerofosfaat per minuut.

De enzymactiviteit wordt berekend door de volgende vergelijking:

$$30 \text{ enzymactiviteit (E/ml)} = \frac{\Delta A \times \text{verdunningsverh.}}{0,05 \times 10} \times \frac{1}{4} \\ = \frac{\Delta A}{2} \times \text{verd.verh.}$$

(B) Fysico-chemische en biochemische eigenschappen:

Enzymactiviteit: katalyseert tenminste de volgende reactie:



Molecuulgewicht: 72000 $\pm$ 7200

72000: gemeten met Sephadex G-100,

65000: gemeten met SDS-polyacrylamide.

Isoëlectrisch punt: 4,5

5	KM-waarde: glycerol	: $4,8 \times 10^{-5}$ M
	dihydroxyaceton	: $6,6 \times 10^{-4}$ M
	D-glyceraldehyde	: $3,5 \times 10^{-4}$ M
	ATP	: 2×10^{-4} M

Substraatspecificiteit:

- 10 (1) specifieke voor glycerol, dihydroxyacetonfosfaat en D-glyceraldehyde:

(Analysemethode)

Reactiemengsel:

	0,2 M tris-HCl buffer (pH 9,0)	0,4 ml
15	0,1 M glycerol, dihydroxyacetonfosfaat of D-glyceraldehyde	0,05 ml
	10 mM ATP	0,1 ml
	10 mM $MgCl_2$	0,1 ml
	gedestilleerd water	0,3 ml
20	0,95 cm ³ reactiemengsel wordt gepreïncubeerd gedurende 3 minuten bij 37°C en de enzymoplossing (opgelost in 10 mM fosfaatbuffer met pH 7,5; 0,05 cm ³) daaraan toegevoegd; daarna wordt 3 minuten bij 37°C geïncubeerd. De reactie wordt beëindigd door 3 minuten koken. Na afkoelen op 37°C wordt de hoeveelheid ADP geanalyseerd. Dit ADP wordt	
25	geanalyseerd door toevoeging van een ADP-analyseoplossing (2,0 cm ³) bestaande uit het volgende mengsel:	
	0,1 M fosfaatbuffer (pH 7,5)	0,1 ml
	0,2 M dimethylglutaraat-NaOH-buffer (pH 7,5)	0,1 ml
	peroxidase (0,5 mg/ml)	0,1 ml
30	0,2% fenol	0,1 ml
	0,3% 4-aminoantipyrine	0,1 ml
	10 mM $MnCl_2$	0,05 ml
	10 mM thiamine-pyrofosfaat	0,03 ml
	1 mM FAD	0,01 ml
35	10 mM fosfoënopruviaat	0,1 ml

8003236

pyruviaat-oxidase (100 E/ml; Toyo Jozo Co.)	0,05 ml
pyruviaat-kinase (4400 E/ml; Sigma Chem. Co)	1 μ l
gedestilleerd water	1,26 ml

Dit reactiemengsel werd 15 minuten bij 37°C geïncubeerd. De gevormde kleur werd gemeten bij 550 nm om de substratspecificiteit te berekenen.

<u>Substraat:</u>	<u>Relatieve activiteit:</u>
glycerol	100%
dihydroxyaceton	74%
10 D-glyceraldehyde	20%

(2) Specifieke activiteit voor nucleotiden:

ATP > CTP > ITP > GTP, UTP

(Analysemethode)

Bij de analysemethode (1) die boven is beschreven werd 10 mM ATP vervangen door CTP, ITP, GTP en UTP en de hoeveelheid gevormd glycerol-3-fosfaat gemeten. Als hieronder weergegeven konden alle genoemde nucleotiden als substraat fungeren; een bijzonder hoge specificiteit voor ATP en CTP is waargenomen.

<u>Substraat:</u>	<u>Relatieve activiteit (%):</u>
20 ATP	100
CTP	92
ITP	47
GTP	19
UTP	18

25 Optimale pH: pH 9-10, als weergegeven in fig. 1.

In deze figuur is α -dimethylglutaraat-NaOH-buffer met pH 6-7,5
 -- tris-HCl-buffer met pH 7-9, 4-4: fosfaatbuffer met pH 6-8,
 4-4 glycine-NaOH-buffer (pH 9-10,5).

pH-stabiliteit: pH 5,5-10 als weergegeven in fig. 2.

30 Dimethylglutaraatbuffer (4-7) en glycine-NaOH-buffer met pH 10-10,5
 elk met daarin 10 mM glycerol werden gebruikt. Geïncubeerd werd 60
 minuten bij 37°C.

Effect van metaalionen en p-chloormercuribenzoaat (PCMB):

	Reagens	concentratie	relatieve activiteit(%)	
			zonder Mg^{++}	1 mM met Mg^{++}
	geen	-	5	100
	$MgCl_2$	1,0 mM	100	100
	$CaCl_2$	1,0 mM	0	54
5	$MnCl_2$	1,0 mM	6	14
	PCMB	$5,0 \times 10^{-6} M$	2	13
	"	$7,5 \times 10^{-6} M$	-	0

Het onderhavige GK wordt dus geactiveerd door Mg^{++} en geremd door Ca^{++} en Mn^{++} . $7,5 \times 10^{-6} M$ PCMB remt de activiteit van dit GK volledig.

10 Warmtestabiliteit: stabiel tot $45^\circ C$ als weergegeven in fig. 3.

Analyse: 10 mM fosfaatbuffer (pH 7,8) met daarin 10 mM glycerol.

GK-incubeerd werd 10 minuten bij $45-75^\circ C$.

15 Als weergegeven behoort het onderhavige enzym tot de enzymgroep, die een reactiekatalyseert van glycerol met ATP tot ADP en L- α -glycerolfosfaat.

Een vergelijking met bekende glycerolkinase uit Candida mycoderma, Escherichia coli en duivenharten levert de volgende resultaten:

Het molecuulgewicht van E.Co-GK is 300.000 en van C.My.-GK is 250.000 (tetrameer van een molecuulgewicht van 60.000), terwijl het
 20 onderhavige GK een monomeer molecuulgewicht van ca. 70.000 bezit. De pH-stabiliteit is 6,5-7 bij E.Co-GK, pH 4,5-5,5 bij 1000 GK en pH 6,7 bij C.My-GK, terwijl de onderhavige pH 5,5-10 bedraagt. Aangezien een reactie met ATP tevens een tweewaardig metaalion vereist, is bij het onderhavige GK tevens Mg^{++} nodig, waarbij bij E.Co-GK en duiven-GK
 25 dit Mg^{++} door Mn^{++} kan worden vervangen. Daarentegen remt Mn^{++} het onderhavige GK. Voorts verschillen de substraatspecificiteiten van elkander. E.Co-GK vertoont een nagenoeg dubbele activiteit voor de hydroxyacetonfosfaat vergeleken met die voor glycerol, terwijl de onderhavige GK specifiek is voor glycerol dan voor dihydroxyacetonfosfaat.
 30 E.Co-GK reageert alleen maar met ATP, terwijl het onderhavige GK met ATP en CTP en tevens met ITP, GTP en UTP reageert. Op grond van het bovenstaande moet geconcludeerd worden dat de onderhavige GK een nieuwe glycerolkinase is.

35 Als gezegd kan de onderhavige GK worden gebruikt als diagnostisch enzym. B.v. kan dit GK worden gebruikt voor het bepalen van triglyceride en glycerol door een reactie met triglyceriden en lipoproteïne lipase,

waarbij een reactiemengsel met GK en ATP wordt geïncubeerd ter vorming van glycerol-3-fosfaat, dat verder wordt geïncubeerd met glycerol-3-fosfaatoxidase waarna de verbruikte zuurstof of het vrijgestelde waterstofperoxide wordt gemeten.

5 Het volgende voorbeeld licht de uitvinding nader toe.

Voorbeeld:

100 cm³ van een medium met pH 7,0 bestaande uit 1,0% pepton, 1,5% glycerol, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄ en 0,2% KCl, rest water in een Erlenmeyer van 500 cm³ werd 20 minuten bij 120°C gesteriliseerd.

10 Vervolgens werd geënt met Streptomyces canus A 2408, FERM-P No. 4977 en drie dagen bij 26°C gekweekt. De verkregen vloeistof werd overgeënt in een bak van 30 l met daarin 20 l van hetzelfde medium, waarna 40 uren aeroob bij 26°C werd gekweekt; daarbij werd geroerd met 300 toeren per minuut en belucht met 20 l/minuut. 2 l van de verkregen
15 fermentatievloeistof werd 10 minuten bij 15000 tpm gecentrifugeerd waarna bij 4°C het mycelium werd geïsoleerd. Dit mycelium werd gesuspenseerd in 800 cm³ GL-buffer en 5 minuten ultrasoon behandeld. De verkregen vloeistof werd 10 minuten bij 15000 tpm en 4°C gecentrifugeerd en 760 cm³ bovenstaande vloeistof gewonnen. Na toevoeging van
20 23 cm³ van een 5%'s protamineoplossing werden de onzuiverheden afgecentrifugeerd bij 4°C en 5000 tpm gedurende 10 minuten. Een verzadigde oplossing van ammoniumsulfaat (pH 7,5, 1125 cm³) werd toegevoegd aan de 760 cm³ vloeistof en wederom 10 minuten bij 4°C en 15000 tpm gecentrifugeerd, waarna het neerslag werd opgevangen. Verder werd
25 37,2 cm³ verzadigde AS met pH 7,5 toegevoegd aan de oplossing van het genoemde neerslag in 62 cm³ GL-buffer, waarbij verdere onzuiverheden werden neergeslagen. Aldus werd 82 cm³ vloeistof verkregen door 10 minuten bij 4°C en 15000 tpm te centrifugeren. Daarna werd nogmaals 20,5 cm³ verzadigde AS met pH 7,5 toegevoegd en nogmaals 10 minuten
30 bij 4°C en 15000 tpm gecentrifugeerd. Het neerslag werd gewonnen.

Dit neerslag werd opgelost in 11,0 cm³ GL-buffer en deze oplossing
aangebracht op een kolom Sephadex G-25 van 3x30 cm, geïmpregneerd met
dezelfde buffer. Hierna werd dezelfde bij 25°C geëluëerd met een door-
stroomsnelheid van 40 cm³/uur. Fracties met een absorptie bij 280 nm
35 werden opgevangen (ca. 21 cm³). Deze werden aangebracht op een kolom

van DEAE-cellulose van 2,2x17 cm, geïmpregneerd met GL-buffer, uitgewassen met GL-buffer (80 cm³, stroomsnelheid 25 cm³/uur, fracties van 5,8 cm³), waarna de onzuiverheden werden weggeëluëerd met een GL-buffer met daarin 0,1 M KCl (stroomsnelheid 25 cm³/uur, fracties van 5,8 cm³). De actieve fracties 63-79 werden opgevangen door een lineaire gradiëntelutie met GL- buffer met daarin 200 cm³ 0,1 M KCl en GL-buffer met daarin 200 cm³ 0,4 M KCl (stroomsnelheid 25 cm³/uur, elke fractie 5,8 cm³). Een gecombineerd actief eluaat van 98 cm³ werd ontzout en geconcentreerd met Amicon XM-50 bij 4°C en wel gedurende 4 uren waarbij 10 cm³ van een geconcentreerde oplossing werd verkregen. Dit concentraat werd gebracht op een kolom calciumfosfaatgel van 2,0x17,2 cm, geïmpregneerd met GL-buffer en uitgewassen met 100 cm³ GL-buffer en geëluëerd door een lineaire gradiënt van GL-buffer, 200 cm³ tot 100 mM fosfaatbuffer met daarin 200 cm³ 100 mM glycerol (stroomsnelheid 25 cm³/uur, een fractie; 6 cm³). De actieve fracties No. 48-58 werden opgevangen en de gecombineerde oplossing geconcentreerd met Amicon XM-50 tot 2 cm³ concentraat. Dit concentraat werd aangebracht op een kolom Biogel P-200 (3 x 60 cm), geïmpregeerd met GL-buffer en geëluëerd met dezelfde buffer (stroomsnelheid 25 cm³/uur, elke fractie 6 cm³), waarna de actieve fracties No. 17-20 werden opgevangen. Deze werden gecombineerd en gelyofiliseerd tot een gezuiverd GK (specifieke activiteit: 57,6 eenh/mg; 16,9 mg proteïne).

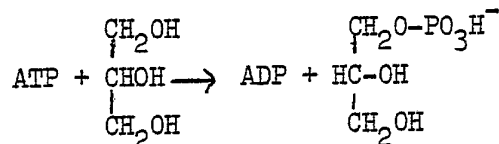
4. In de tekening stellen voor:

- fig. 1 een optimale pH-kromme voor het onderhavige GK,
- fig. 2 de pH-stabiliteitskromme voor het onderhavige GK en
- fig. 3 de hittestabiliteitskromme voor het onderhavige GK.

CONCLUSIES:

1. Nieuwe glycerolkinase met de volgende eigenschappen:

(1) enzymactiviteit: katalyseert tenminste de volgende reactie:



(2) molecuulgewicht : 72000 - 7200,

(3) isoëlectrisch punt: 4,5,

(4) Km-waarde: glycerol $4,8 \times 10^{-5}$ M

dihydroxyaceton $6,6 \times 10^{-4}$ M

D-glyceraldehyde $3,5 \times 10^{-4}$ M

ATP 2×10^{-4} M

(5) Specifiek voor de nucleotiden: ATP > CTP > ITP > GTP, UTP,

(6) optimale pH: pH 9-10,

(7) pH-stabiliteit: pH 5,5-10,

(8) effect van metaalionen: gestimuleerd door Mg^{++} , geremd door Ca^{++} en Mn^{++} ,

(9) warmtestabiliteit: stabiel tot 45°C .

2. Werkwijze voor het bereiden van een glycerolkinase, met het kenmerk, dat men een glycerolkinase-producerend microorganisme kweekt in een voedingsmedium met daarin kool- en stikstofbronnen alsmede anorganische zouten, waarna het verkregen glycerolkinase wordt geïsoleerd.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat als glycerolkinase-producerend organisme een glycerolkinase-producerend organisme behorend tot het geslacht Streptomyces wordt toegepast.

4. Werkwijze volgens conclusie 2 of 3, met het kenmerk, dat als microorganisme Streptomyces canus A 2408 wordt toegepast.

5. Werkwijze volgens conclusies 2, 3 of 4, met het kenmerk, dat als koolstofbron glycerol wordt gebruikt.

FIG. 1

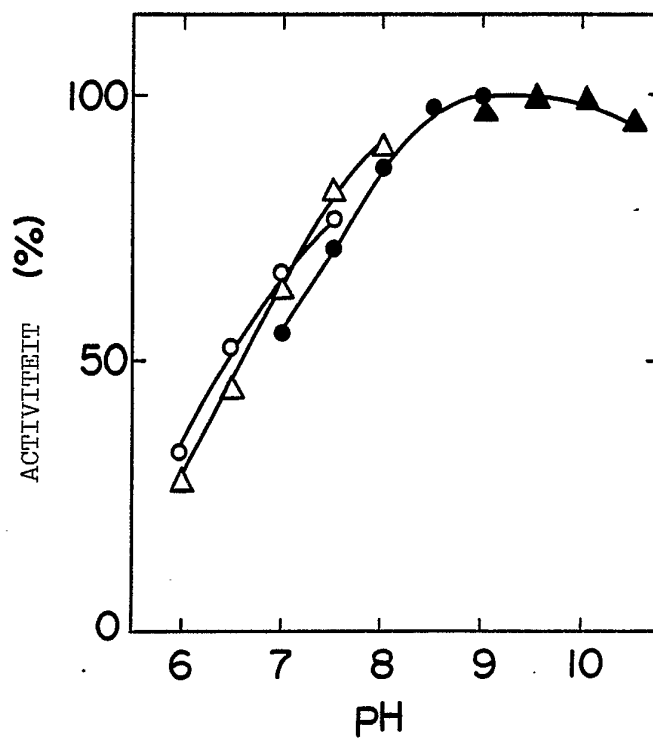
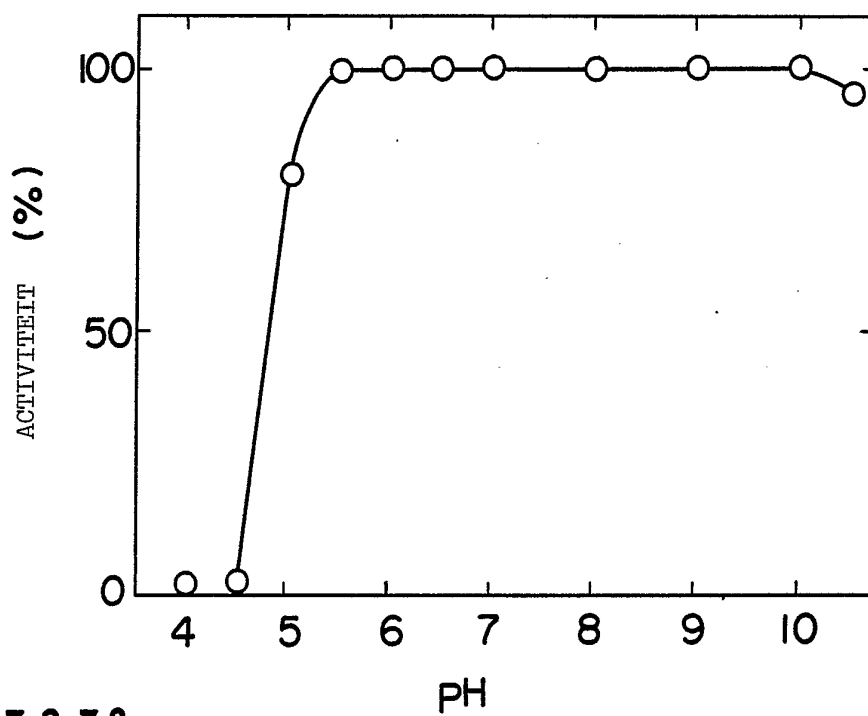


FIG. 2

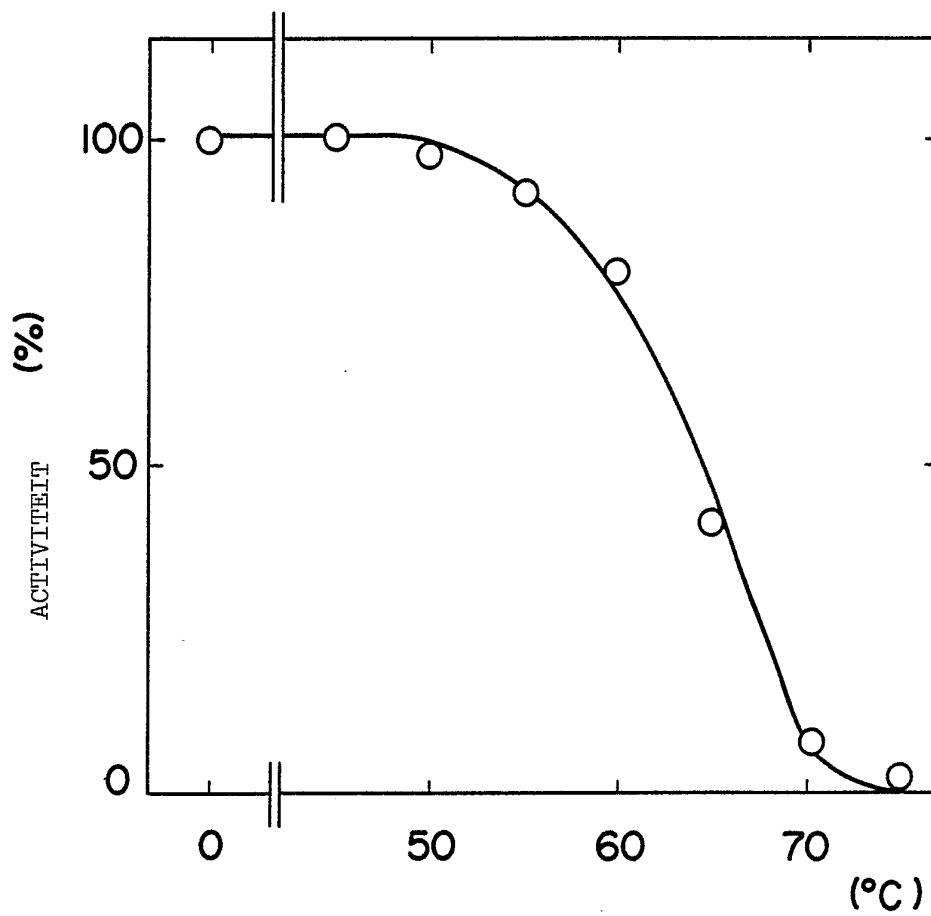


8003236

00rspr.

Toyo Jozo Kabushiki Kaisha.

FIG. 3



Toyo Jozo Kabushiki Kaisha