

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

**N° 82 11073**

---

⑤④ Procédé de dosage pour composant apparenté aux lipides, composition pour dosage et procédé de production d'enzyme utilisée à cet effet.

⑤① Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 Q 1/26.

②② Date de dépôt..... 24 juin 1982.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : Japon, 25 juin 1981, n° 56-99314; 18 septembre 1981, n° 56-148313.

④① Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 52 du 31-12-1982.

---

⑦① Déposant : TOYO JOZO KK, résidant au Japon.

⑦② Invention de : Shigeyuki Imamura, Hideo Misaki, Hidehiko Ishikawa et Kazuo Matsuura.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

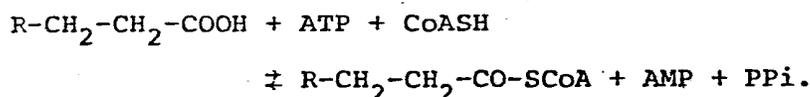
⑦④ Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin et Schrimpf,  
26, av. Kléber, 75116 Paris.

---

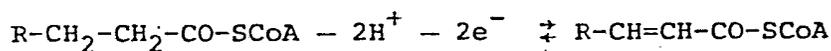
La présente invention concerne un procédé de dosage pour un composant dans un échantillon, par exemple un acide gras libre, un acide gras libre libéré à partir d'un ester d'acide gras, un ester d'acide gras, ou une activité enzymatique qui génère un acide gras libre à partir d'un ester d'acide gras. L'invention comprend également un procédé pour la production d'une enzyme ayant les activités de l'énoyl-CoA-hydratase, de la 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase et de la 3-cétoacyl-CoA-thiolase dans une seule protéine enzymatique utilisée à cet effet.

Les enzymes connues jusqu'à présent pour la  $\beta$ -oxydation des acides gras et leurs actions enzymatiques sont les suivantes:

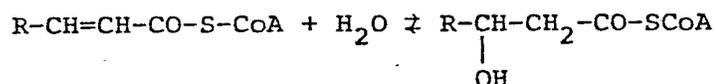
15 - [Réaction I: acyl-CoA synthétase, EC 6. 2. 1. 3]



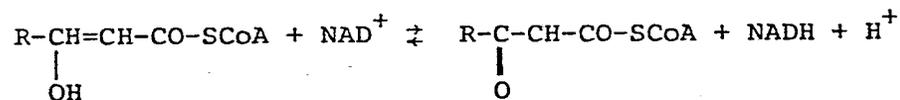
- [Réaction II: acyl-CoA déshydrogénase, EC 1. 3. 99. 3]  
(ou acyl-CoA oxydase)



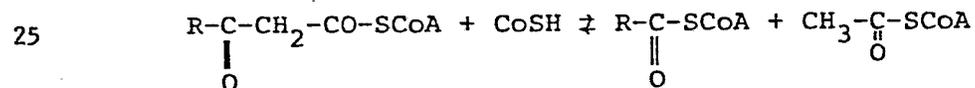
20 - [Réaction III: énoyl-CoA hydratase, EC 4. 2. 1. 17]



- [Réaction IV: 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, EC 1. 1. 1. 35]



- [Réaction V: 3-cétoacyl-CoA thiolase, EC 2. 3. 1. 16]



Jusqu'à présent les dosages enzymatiques des acides gras dans un spécimen de sérum sont connus sous la forme suivante.

On traite un spécimen contenant un acide gras libre avec de l'acyl-CoA-synthétase en présence de CoASH (coenzyme A) et d'ATP (adénosine triphosphate) pour générer de l'acyl-CoA, de l'AMP (adénosine monophosphate) et du pyrophosphate. On traite l'AMP formé avec une activité de myokinase en présence d'ATP pour former deux rapports molaires d'ADP (adénosine diphosphate) à partir d'un rapport molaire d'AMP. En outre on traite l'ADP ainsi formé avec du phosphoénolpyruvate en présence d'une activité de pyruvate kinase pour former de l'ATP et du pyruvate que l'on traite avec de la lactate déshydrogénase et du NAS réduit (nicotine adénine dinucléotide) pour libérer le lactate et le NAD, la quantité de NAD réduit consommée étant mesurée par photométrie avec diminution de la densité optique à 340 nm, et on calcule ainsi les deux rapports molaires de NAS réduit consommé à partir d'un rapport molaire d'acide gras. [Analytical Biochemistry, 98, 341-345 (1979)].

On connaît un autre procédé de dosage d'un acide gras libre.

On fait réagir l'acide gras libre avec du CoASH et de l'ATP en présence d'acyl-CoA-synthétase pour former de l'acyl-CoA, de l'AMP et du pyrophosphate. L'acyl-CoA formé consomme de l'oxygène en présence d'acyl-CoA-oxydase pour former du 2,3-trans-énoyl-CoA et du peroxyde d'hydrogène. On fait réagir le peroxyde d'hydrogène ainsi formé avec de la 4-aminoantipyrine, du 2,4-dibromophénol et de la peroxydase pour former un complexe coloré que l'on mesure par colorimétrie [Anal. Biochem., 108, 6-10 (1980)].

Ces procédés de dosage ont un certain nombre d'inconvénients. Dans un procédé utilisant l'activité d'acyl-CoA-oxydase, on réduit le peroxyde d'hydrogène formé avec CoASH et la seconde étape réactionnelle doit être conduite après qu'on ait remplacé le CoASH restant de la première étape

réactionnelle vers une substance non réductrice par du N-éthylmaléimide. La réaction simultanée est donc impossible. Un autre inconvénient est que l'activité de lipase dans le sérum est très faible et donc que la quantité d'acide gras libre libérée à partir d'ester d'acide gras, substrat du dosage de l'activité de lipase, est très faible. Ces procédés ne peuvent pas fournir un procédé de dosage sensible. Dans le premier procédé de dosage, la détermination quantitative de la quantité diminuée de 2 rapports molaires de NAD réduit à partir d'un rapport molaire d'acide gras présente une sensibilité insuffisante.

On a trouvé que l'on peut doser de façon avantageuse l'acide gras libre ou l'acide gras libre libéré à partir de son ester dans l'échantillon par la combinaison des procédés dans lesquels on transforme l'acide gras en acyl-CoA, qui est transformé en déshydroacyl-CoA, on transforme le déshydroacyl-CoA en hydroxyacyl-CoA, on transforme l'hydroxyacyl-CoA en cétoacyl-CoA, et en transformant le cétoacyl-CoA en acyl-CoA.

L'acyl-CoA produit dans l'étape réactionnel finale possède un acyl-CoA dans lequel le groupe acyle est plus court de 2 atomes de carbone par comparaison avec l'acide gras dans l'échantillon. Ledit acyl-CoA est également décomposé en déshydroacyl-CoA, hydroxyacyl-CoA et cétoacyl-CoA pour constituer le cycle qui forme un acide gras plus court de 2 atomes de carbone.

Ledit cycle indique le cycle d'ordre supérieur selon le nombre de carbones de l'acide gras dans l'échantillon. Dans les réactions cycliques d'ordre élevé, on peut détecter des rapports molaires supérieurs des composants qui se forment ou qui sont consommés en partant d'un rapport molaire d'acide gras, sous forme de modifications détectables par divers procédés.

Dans ce procédé de dosage, l'acide gras dans l'échantillon est décomposé comme suit.

- (a) l'acyl-CoA est formé par l'action de l'activité d'acyl-CoA-synthétase en présence d'ATP ou de GTP et de CoASH;
- (b) l'acyl-CoA est changé en déshydroacyl-CoA par l'activité d'acyl-CoA-oxydase et l'oxygène;
- 5 (c) le déshydroacyl-CoA est changé en hydroxyacyl-CoA par l'activité d'énoyl-CoA-hydratase et l'eau;
- (d) l'hydroxyacyl-CoA est transformé en cétoacyl-CoA par le NAD et l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; et
- (e) le cétoacyl-CoA est transformé en un acyl-CoA ayant deux  
10 atomes de carbone de moins par CoASH et la 3-cétoacyl-CoA-thiolase. L'acyl-CoA ainsi produit est à nouveau décomposé par l'intermédiaire d'un cycle de  $\beta$ -oxydation où l'on détecte les changements détectables dans le cycle.

On a également trouvé qu'une souche bactérienne appartenant au genre Pseudomonas, isolée à partir d'un échantillon de sol recueilli dans un verger de pêchers à Sudama-cho, Kitakoma-gun, Yamanashi-ken au Japon produit une enzyme ayant des activités enzymatiques multiples d'énoyl-CoA hydratase de la réaction III ci-dessus, de 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de la réaction IV ci-dessus et de 3-cétoacyl-CoA thiolase de la réaction V ci-dessus, dans une seule  
20 protéine enzymatique (désignée ci-dessous comme enzyme multi-active), et que ladite enzyme multi-active peut être appliquée pour un dosage d'acide gras.

25 La souche bactérienne B-0771 a les propriétés taxonomiques suivantes:

(A) Observation macroscopique:

(1) Plaque de gélose nutritive:

30 Colonies convexes, rondes, bords lisses, semi-lustrées, blanc grisâtre à jaune pâle. Pas de formation de pigment soluble.

(2) Culture en biseau sur gélose nutritive:

Bonne croissance linéaire. Semi-lustrée, blanc grisâtre à jaune pâle. Pas de formation de pigment soluble.

## (3) Culture liquide:

Précipitation d'un trouble homogène. Pas de formation de capsule.

## (B) Observation microscopique:

- 5 Bacilles droits ou légèrement courbés. Chaînes uniques ou doubles, quelquefois longues. 0,4-0,6 x 0,5-3,0 µm. Motiles avec flagelle polaire. Pas de formation de spore.

## (C) Caractères physiologiques et biochimiques:

10	Coloration de Gram	-
	Test O.F.	0
	Catalase	+
	Oxydase	+
	Lécithinase	-
15	Uréase milieu SSR	-
	milieu de Christensen	+
	Hydrolyse de la gélatine	-
	Hydrolyse de l'amidon	-
	Hydrolyse de la caséine	-
20	Hydrolyse de l'esculine	-
	Hydrolyse de l'arginine	+
	Accumulation de poly-β-hydroxybutyrate (PHB)	-
	Formation d'indole	-
25	Formation de sulfate acide	-
	Formation d'acétoïne	-
	Test MR	-
	Réduction du nitrate	-
	Utilisation du citrate	+

## 30 Formation d'acide à partir du sucre:

Formation d'acide, pas de formation de gaz:

- 35 L(+)-arabinose, cellobiose, fructose, fucose, galactose, glucose, glycérine, lactose, maltose, mannose, mélibiose, rhamnose, saccharose, tréhalose, xylose.

Pas de formation d'acide, pas de formation de gaz:

Adnitol, dulcitol, méso-érythritol, inositol,  
inuline, mannitol, mélézitose, raffinose, salicine,  
sorbose, sorbitol, amidon.

5 Comme il est dit ci-dessus, la souche B-0771, ayant  
des propriétés de Gram-négativité, de motilité avec un  
flagelle polaire, étant positive vis-à-vis de la catalase  
et de l'oxidase, avec la nature aérobie de la décomposition  
oxydative du glucose, est reconnue comme microorganisme  
10 appartenant au genre Pseudomonas.

Si l'on se réfère à la description se rapportant à  
Pseudomonas fragi dans J. Gen. Microbiol., 25, 379-408 (1961),  
les souches sont identiques comme on le voit ci-dessous:

	Souche B-0771	<u>Pseudomonas</u> <u>fragi</u>
15		
	Décomposition de l'arginine	+
	Accumulation du PHB	-
	Liquéfaction de la gélatine	-
	Hydrolyse de l'amidon	-
20	Hydrolyse de la caséine	-
	Décomposition de l'esculine	-
	Formation d'indole	-
	Formation d'H <sub>2</sub> S	-
	Formation d'acétoïne	-
25	Réduction du nitrate	d
	Utilisation du citrate	+

En outre, on procède à des études comparatives de la souche  
B-0771 et de la culture type Pseudomonas fragi ATCC 4973.  
Le résultat est donné au Tableau 1.

Tableau 1

	Souche B-0771	<u>Pseudomonas fragi</u> ATCC 4973
	-	-
5	+	+
	polaire	polaire
	0	0
	+	+
	+	+
10		
	-/(+)	-/(+)
	+	
	-	-
	-	-
15	-	-
	-	-
	-	-
	-	-
	-	-
20	-	-
	+	+
	-	-
25	+	+
	+	+
	-	-
	-	-
	+	+
30	+	+
	+	+
	+	+
	(+)	+

	Inositol	-	-
	Inuline	-	-
	Lactose	+	+
	Maltose	+	+
5	Mannitol	-	-
	Mannose	+	+
	Mélezitose	-	-
	Mélibiose	+	+
	Raffinose	-	-
10	L(+)-rhamnose	(+)	+
	Salicine	-	-
	L-sorbose	-	-
	Amidon	-	-
	Saccharose	+	+
15	Tréhalose	+	+
	Xylose	+	+

Comme on le voit dans le tableau ci-dessus, la souche B-0771 a des propriétés taxonomiques semblables à celles de la souche de culture type Pseudomonas fragi ATCC 4973.

20 La souche B-0771 est désignée comme Pseudomonas fragi B-0771 et a été déposée au Fermentation Institute, Agency of Industrial Technology & Sciences, M.I.T.I., Japon avec dans sa collection de cultures permanentes n°FERM-P n° 5701.

25 L'invention a été réalisée selon les connaissances exposées ci-dessus.

L'invention a pour objet de fournir un procédé de dosage pour un composant dans un échantillon comprenant les processus réactionnels suivants:

- 30
- (a) un procédé transformant l'acide gras en acyl-CoA;
  - (b) un procédé transformant l'acyl-CoA en déshydroacyl-CoA;
  - (c) un procédé transformant de déshydroacyl-CoA en hydroxyacyl-CoA;

(d) un procédé transformant l'hydroxyacyl-CoA en cétoacyl-CoA;

(e) un procédé transformant le cétoacyl-CoA en acyl-CoA; et un procédé détectant les changements détectables.

5 Un autre objet de l'invention est de fournir une composition pour dosage comprenant au moins:

- ATP ou GTP;

- CoASH;

- NAD;

10 - acyl-CoA-synthétase;

- acyl-CoA-oxydase;

- énoyl-CoA-hydratase;

- 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase; et

- 3-cétoacyl-CoA-thiolase.

15 L'invention a encore pour objet de fournir un procédé de production d'une enzyme multiactive dans lequel on cultive un microorganisme producteur d'enzyme multiactive appartenant au genre Pseudomonas et on isole l'enzyme ainsi obtenue.

20 Un échantillon à doser dans l'invention est au moins un échantillon contenant un acide gras. Comme exemples d'acides gras on peut citer l'acide caproïque en  $C_6$ , l'acide caprylique en  $C_8$ , l'acide caprique en  $C_{10}$ , l'acide laurique en  $C_{12}$ , l'acide myristique en  $C_{14}$ , l'acide palmitique en  $C_{16}$ , l'acide palmitoléique, l'acide stéarique en  $C_{18}$ , l'acide oléique, l'acide linoléique ou l'acide linoléique.

25 D'autres exemples d'acides gras à analyser sont les acides gras libres ou les esters d'acides gras comme composants dans les produits laitiers comme le beurre, la margarine, le fromage, le jambon, le lait ou la mayonnaise; les acides gras libres ou les esters d'acides gras dans un spécimen  
30 comme le sang et l'urine; les produits de réaction provenant d'une action enzymatique sur ces corps; l'acide gras libre ou son sel et l'ester d'acide gras comme composants dans la  
35 préparation des médicaments; ou l'acide gras comme substrat

pour un réactif enzymatique commercial ou l'acide gras libéré à partir de l'action d'un réactif enzymatique du commerce.

5 On peut libérer l'acide gras à partir de l'ester d'acide gras par saponification alcaline en utilisant de l'hydroxyde de sodium ou de l'hydroxyde de potassium, ou par action enzymatique.

10 Dans la combinaison de l'ester d'acide gras et de l'activité enzymatique sur ce corps pour générer l'acide gras, on peut doser l'ester d'acide gras après avoir généré l'acide gras, et on peut également doser l'activité enzymatique en dosant l'acide gras libéré à partir de l'échantillon contenant l'ester d'acide gras. Ladite combinaison ne peut être limitée, et on peut inclure toute  
15 combinaison qui libère un acide gras.

Dans la combinaison, cet ester d'acide gras est un triglycéride comme le monoglycéride, le diglycéride ou le triglycéride, et l'activité enzymatique est l'activité de lipase; on peut doser le glycéride ou l'activité de lipase  
20 en déterminant l'acide gras libéré à partir du glycéride.

On applique ces dosages pour le dosage des triglycérides dans le sérum et le dosage de la lipase pancréatique dans le sérum. Dans ce dernier cas, on peut prévenir un trouble dans le système réactionnel en utilisant de  
25 préférence un mono- ou un diglycéride et on ajoutant de l'albumine comme l'albumine de boeuf.

On trouvera ci-dessous un exemple de système de combinaison d'ester d'acide gras et d'enzyme agissant sur ledit ester d'acide gras.

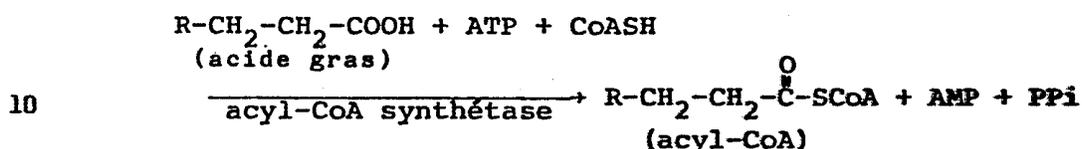
	<u>Ester d'acide gras :</u>	<u>Activité enzymatique:</u>
	lécithine	phospholipase A <sub>1</sub> ,
		phospholipase A <sub>2</sub> ou
		phospholipase B
5	lysolécithine	lysophospholipase
	phosphatidate	phosphatidate phosphatase
		et lipase
	lécithine	phospholipase C et lipase
	lécithine	phospholipase D, phosphatidate phosphatase et
10		lipase
	acylcholine	choline estérase
	ester de cholestérol	cholestérol estérase
	lécithine et cholestérol	lécithine.cholestérol.acyl-
15		transférase, cholestérol
		estérase ou lysophospho-
		lipase.

On peut doser les composants qui sont en relation avec l'acide gras comme les substrats et enzymes ci-dessus en dosant l'acide gras. Dans les systèmes qui libèrent un acide gras, on choisit comme on le désire les quantités de réactif utilisées en fonction de l'objectif et des conditions réactionnelles, et en principe la quantité d'acide gras libérée par la réaction suffit. La température réactionnelle pour libérer l'acide gras est habituellement d'environ 37°C, et la durée de réaction doit naturellement être suffisante pour libérer l'acide gras, et dépasse une minute.

On trouvera ci-dessous des mode de réalisation des procédés réactionnels (a), (b), (c), (d) et (e) ci-dessus.

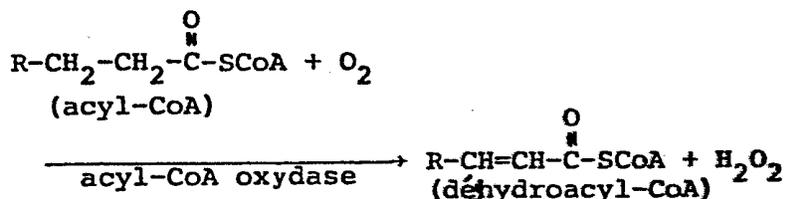
(a) Procédé réactionnel changeant l'acide gras en acyl-CoA:

5 Ainsi on peut mentionner un procédé réactionnel consistant en une activité d'acyl-CoA-synthétase qui catalyse une réaction à partir d'acide gras, d'ATP et de CoASH en acyl-CoA, AMP et pyrophosphate (PPi), ATP et CoASH.



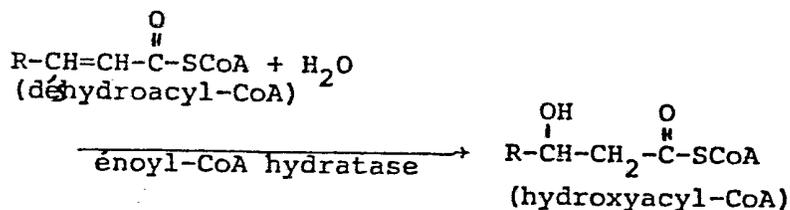
(b) Procédé réactionnel changeant l'acyl-CoA en déshydroacyl-CoA:

15 On peut mentionner par exemple un procédé réactionnel consistant en une activité d'acyl-CoA oxydase qui catalyse une réaction à partir d'acyl-CoA et d'oxygène en déshydroacyl-CoA et peroxyde d'hydrogène, avec oxygène.



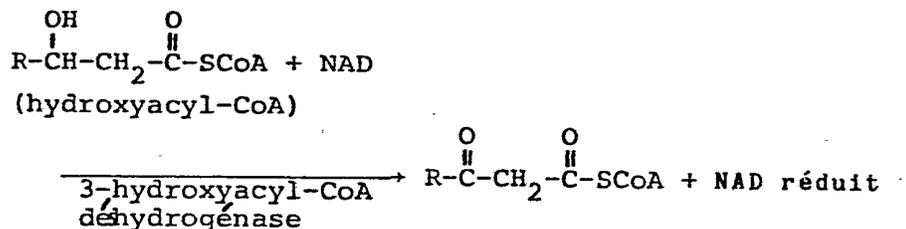
20 (c) Procédé réactionnel changeant le déshydroacyl-CoA en hydroxyacyl-CoA:

25 Ainsi on peut mentionner un procédé réactionnel consistant en une activité d'énoyl-CoA-hydratase qui catalyse une réaction à partir de déshydroacyl-CoA en hydroxyacyl-CoA en présence d'eau, avec l'eau.



(d) Procédé réactionnel changeant l'hydroxyacyl-CoA en cétoacyl-CoA:

Ainsi on peut mentionner le procédé réactionnel dans lequel la 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase catalyse une  
 5 réaction à partir d'hydroxyacyl-CoA et de NAD en cétoacyl-CoA et NAD réduit, avec du NAD.



Les enzymes utilisées dans les procédés ci-dessus  
 peuvent être des enzymes provenant d'animaux ou de microorga-  
 nismes. On peut utiliser des enzymes que l'on trouve dans le  
 10 commerce et des enzymes que l'on isole quelle que soit leur  
 origine.

On trouvera ci-dessous des modes de réalisation pour  
 l'origine de l'acyl-CoA-synthétase.

Foie de cobaye [J. Biol. Chem., 204. 329 (1953);  
 15 foie de rat, de souris, de boeuf, de porc (brevet japonais non  
 soumis à l'inspection publique, n° 55-74791);

Escherichia coli [Eur. J. Biochem., 12, 576 (1970)];  
Bacillus megaterium [Biochem., 4(1), 85 (1965)];  
Aerobacter aerogenes IFO 3318, Serratia marcescens IFO 3052,  
Proteus mirabilis IFO 3849, Staphylococcus aureus IFO 3060,  
5 Pseudomonas aeruginosa IFO 3919, Fusarium oxysporum IFO 5942,  
Gibberella fujikuroi IFO 6604 et Candida lipolytica IFO 0717  
[J. Bacteriol., 105(3), 1216 (1971), *ibid.*, 114(1), 249 (1973),  
Brevet japonais non soumis à l'inspection publique  
N° 55-74790, *ibid.* N° 55-99187].

10 Un autre mode de réalisation d'acyl-CoA synthétase  
est une enzyme qui catalyse une réaction à partir d'acide  
gras, de GTP et de CoASH en acyl-CoA, GDP et orthophosphate.  
[foie de boeuf, J. Biol. Chem., 239(6), 1694 (1964)].

15 Comme modes de réalisation pour l'origine de l'acyl-  
CoA oxydase, on peut citer:  
foie de rat [Biochem. Biophys. Res. Comm., 83(2), 479 (1978)];  
Candida utilis, Candida lipolytica IFO 1548, Candida tropi-  
calis IFO 0589, Saccharomyces cerevisiae IFO 0213, Saccharo-  
myces cerevisiae Y0036 FERM-P No. 5174 (DSM 2138) [Brev. Jap.  
20 non soum. à ins. Publ. No. 56-61991];  
Eupenicillium javanicum IFO 7992, Monascus sp. M-4800  
FERM-P No. 5225 (DSM 2136) [*ibid.*, No. 56-61991];  
Aspergillus candidus M-4815 FERM-P No. 5226 (DSM 2135)  
[*ibid.*, No. 56-61991]; Arthrobacter sp. B-0720 FERM-P No.  
25 5224 (DSM 2137) (*ibid.*, No. 51-61991); Macrophomina  
phaseoli ATCC 14383, Cladosporium resinae IFO 6367 [Arch.

Biochem. Biophys., 176, 591 (1976), Brev. Jap. non soum. à insp.  
Publ. No. 55-118391, *ibid.*, No. 56-8683, *ibid.*, No.56-61991].

L'acyl-CoA oxydase ci-dessus peut être remplacée par  
l'acyl-CoA déshydrogénase [EC 1. 3. 99. 3, acyl-CoA:  
5 (accepteur) oxydoréductase]. On peut obtenir cette enzyme  
par exemple à partir de foie de porc, de boeuf et de mouton

[J. Biol. Chem., 218, 717 (1956), *ibid.*, 218, 701  
(1956), J. Am. Chem. Soc., 75, 2787 (1953), Biochim. Biophys. Acta,  
22, 475 (1956)].

10 Dans la réaction d'acyl-CoA en déshydroacyl-CoA, on  
utilise un accepteur d'électrons, par exemple le 2,6-dichloro-  
phénol indophénol, le chlorure de 2-(p-iodo-phényl)-3-(p-  
nitrophényl)-5-phényl-2H-tétrazolium (INT), le bromure de  
3-(4,5-diméthyl)-2-thiazolyl-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT),  
15 3,3'-(4,4'-biphénylène)-bis(chlorure de 2,5-diphényl-2H-  
tétrazolium) (néo-TB), 3,3'-(3,3'-diméthoxy-4,4'-  
biphénylène)-bis[chlorure de 2-(p-nitrophényl)-5-phényl-  
2H-tétrazolium (NTB), 3,3'-(3,3'-diméthoxy-4,4'-bis[chlorure  
de 2,5-bis(p-nitrophényl)-2H-tétrazolium (TNTB) ou 3,3'-  
20 (3,3'-diméthoxy-4,4'-biphénylène)-bis-(chlorure de 2,5-  
diphényl-2H-tétrazolium ) (TB), avec du méthosulfate de  
phénazine.

En outre il peut être préférable d'isoler des tissus  
qui les contiennent les enzymes présentant une activité  
25 d'énoyl-CoA-hydratase, une activité de 3-hydroxyacyl-CoA-  
déshydrogénase et une activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase.

[J. Biol. Chem., 218, 971 (1956), *ibid.*, 207,  
631 (1954), *ibid.*, 208, 345 (1954), Angew. Chem., 64, 687 (1952),  
et Biochim. Biophys. Acta, 26, 448 (1957).]

On utilise de préférence une enzyme multi-active comprenant une activité d'énoyl-CoA-hydratase, une activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase et une activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase en une seule protéine enzymatique.

5 Comme exemples de microorganismes produisant ledit enzyme, on peut citer Escherichia coli [Proc. Natl. Acad. Sci., 74(2), 492 (1977)] et Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701.

L'enzyme obtenue à partir de Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701 possède les propriétés suivantes:

10 (1) Procédé de dosage de l'activité enzymatique:

(a) procédé de dosage de l'activité d'énoyl-CoA-hydratase:

	tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 9,0)	0,4 ml
	KCl 1M	0,1 ml
	NAD 40 mM	0,1 ml
15	Palmiténoyl-CoA 15 mM	0,1 ml
	Sérumalbumine de boeuf à 1%	0,05 ml
	Bleu de nitrotétrazolium à 0,25%	0,1 ml
	3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase 125 U/ml (Boehringer)	0,01 ml
20	Eau distillée	0,04 ml
	Total	1,00 ml

On fait préincuber le mélange réactionnel ci-dessus à 37°C pendant 2 minutes, et on y ajoute une solution enzymatique, puis on fait incuber à 37°C pendant 10 minutes.

25 On ajoute du dodécylsulfate de sodium à 0,5% (2,0 ml) pour arrêter la réaction et on mesure la densité optique (absorption à  $\Delta A_{550}$ ) par la longueur d'onde à 550 nm.

On définit une unité (1 U) d'enzyme comme la quantité d'enzyme qui génère un  $\mu$ mole de NAD réduit en une minute.

30 L'activité enzymatique est définie par l'équation suivante:

$$\text{Activité enzymatique (U/ml)} = \Delta A_{550} \times \frac{1}{4} \times \frac{1000}{50} \times \frac{1}{10}$$

## (b) Procédé de dosage de la 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase :

	Tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,5)	0,5 ml
	KCl 1M	0,05 ml
	NAD 40 mM	0,1 ml
5	3-hydroxypalmitoyl-CoA 15 mM	0,1 ml
	Sérumalbumine de boeuf à 1%	0,05 ml
	Bleu de nitrotétrazolium à 0,25%	0,1 ml
	Diaporase 30 U/ml	0,1 ml
	Total	<hr/> 1,00 ml

10 On ajoute une solution enzymatique (50  $\mu$ l) au mélange réactionnel ci-dessus, que l'on fait préincuber à 27°C pendant 2 minutes, et que l'on fait incuber à 37°C pendant 10 minutes. On ajoute du dodécylsulfate de sodium à 0,5% (2,0 ml) pour arrêter la réaction et on mesure la capacité d'absorption

15 à 550 nm ( $\Delta A_{550}$ ). Une unité (1 U) est définie comme la quantité d'enzyme qui génère 1  $\mu$ mole de NAD réduit en une minute. L'activité enzymatique est définie par l'équation suivante.

$$\text{Activité enzymatique (U/ml)} = \Delta A_{550} \times \frac{1}{4} \times \frac{1000}{50} \times \frac{1}{10}$$

## 20 (c) Procédé de dosage de la 3-cétoacyl-CoA-thiolase:

	Tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)	0,2 ml
	CoASH 10 mM	0,05 ml
	3-cétopalmitoyl-CoA 0,2 mM	0,1 ml
	MgCl <sub>2</sub> 100 mM	0,1 ml
25	Dithiothréitol 1 mM	0,1 ml
	Eau distillée	0,45 ml
	Total	<hr/> 1,00 ml

Au mélange réactionnel dans une cellule de quartz de 1 ml à 37°C on ajoute 20 µl de solution enzymatique et on fait incuber à 37°C. On compense à intervalles réguliers la diminution de 3-cétopalmitoyl-CoA consommé selon la réaction en changeant la densité optique (capacité d'absorption) à 303 nm ( $OD_{303}$ ). On définit une unité (1 U) comme la quantité d'enzyme qui consomme 1 µmole de 3-cétopalmitoyl-CoA en une minute. L'activité enzymatique est définie dans l'équation suivante.

$$\text{Activité enzymatique (U/ml)} = (OD_{303}/\text{min.}) \times \frac{1}{13,5} \times \frac{1000}{20}$$

(2) Action enzymatique:

On observe les activités enzymatiques suivantes.

Enoyl-CoA-hydratase: catalyse une réaction qui forme une mole d'hydroxyacyl-CoA à partir d'une mole de déshydroacyl-CoA et d'une mole d'eau.

3-hydroxyacyl-CoA-déhydrogénase: catalyse une réaction qui forme une mole de cétoacyl-CoA et une mole de NAD réduit à partir d'une mole d'hydroacyl-CoA et d'une mole de NAD.

3-acétoacyl-CoA-thiolase: catalyse une réaction qui forme une mole d'acyl-CoA et une mole d'acétyl-CoA à partir d'une mole de cétoacyl-CoA et une mole de CoASH.

(3) Démonstration de l'existence d'une seule protéine enzymatique:

On prépare l'enzyme brute à partir de cellules microbiennes de Pseudomonas fragi B-0771 et on purifie à travers plusieurs procédés de purification. On mesure chaque activité enzymatique selon les procédés de dosage ci-dessus. Les résultats sont donnés au Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

	Activité d'énoyl-CoA hydratase (U/mg)	Activité de 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (U/mg)	Activité de 3-cétoacyl-CoA thiolase (U/mg)
5 Enzyme brute	36,1	18,2	15,1
10 Colonne de DEAE-cellulose CL-6B	58,9	30,0	24,5
Colonne de gel d'hydroxyapatite	210,3	105,0	85,6
15 Colonne de Toyopeal HW-60	216,5	110,0	90,2

(L'activité enzymatique est corrigée par une quantité de protéine enzymatique).

20 Chaque activité enzymatique correspond exactement à un rapport d'activité à chaque étape de purification et ces trois activités enzymatiques restent dans la même protéine. Lesdites trois activités enzymatiques sont donc situées dans une seule protéine enzymatique.

25 En outre, l'enzyme purifiée (2,0 mg) obtenue dans l'exemple ci-dessus (purifiée par chromatographie sur colonne de Toyopeal HW-60) est introduite dans un appareil d'électrophorèse à foyer isoélectrique en utilisant un ampholyte support, et on mesure chacune des activités enzymatiques. On observe trois activités enzymatiques en un  
30 seul pic dans une fraction à pH 4,9.

## (4) Spécificité du substrat:

On mesure l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase en utilisant du 3-hydroxyacyl-CoA ayant les nombres de carbone suivants:

5	<u>Substrat :</u>	<u>Activité relative (%) :</u>
	3-hydroxycaproyl-CoA	56,5
	3-hydroxycaprylyl-CoA	88,1
	3-hydroxycapryl-CoA	99,0
	3-hydroxylauryl-CoA	100,0
10	3-hydroxymyristoyl-CoA	98,0
	3-hydroxypalmitoyl-CoA	75,5
	3-hydroxystéaryl-CoA	30,5
	3-hydroxyarachidoyl-CoA	9,5
	3-hydroxyoléyl-CoA	57,5
15	3-hydroxylinolényl-CoA	99,0

L'enzyme possède également au moins une spécificité de substrat sur palmitoénoyl-CoA et 3-cétopalmitoyl-CoA.

## (5) pH optimal:

On utilise le 3-hydroxypalmitoyl-CoA comme substrat.

20 On mesure l'activité de 3-hydroxy-acyl-CoA en utilisant le tampon tris-HCl à pH 7,5-9,5. Le résultat est donné dans la figure 1. Le pH optimal est à environ pH 9.

## (6) Stabilité du pH:

25 On fait incuber une solution enzymatique (5 U/ml) dissoute dans diverses solutions tampon 10 mM (pH 4-7: tampon diméthylglutarate-NaOH, pH 7,5-9: tampon Tris-HCl) à 37°C pendant 60 minutes, et on mesure l'activité restante selon un procédé de dosage de l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Le résultat est donné dans la figure 2, où

l'enzyme est stable à pH 5-8.

(7) Stabilité à la chaleur:

On fait incuber une solution enzymatique (15 U/ml) dissoute dans un tampon diméthylglutarate 10 mM-NaOH (pH 7,0) à diverses températures pendant 10 minutes et on mesure l'activité restante selon un procédé de dosage de l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase.

Le résultat est donné dans la figure 3, où l'enzyme est stable jusqu'à environ 50°C.

(8) Point isoélectrique:

On applique une concentration isoélectrique en utilisant un ampholyte support pour mesurer le point isoélectrique de l'enzyme, ce point isoélectrique étant à pH 4,9.

(9) Effet des ions métalliques:

On mesure l'effet des ions métalliques sur l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase.

Ion métallique	Activité relative (%)
Témoin	100
1 mM CaCl <sub>2</sub>	113
1 mM MgCl <sub>2</sub>	113
1 mM MnCl <sub>2</sub>	32
1 mM ZnCl <sub>2</sub>	25
1 mM CuCl <sub>2</sub>	12
1 mM BaCl <sub>2</sub>	106
1 mM NiCl <sub>2</sub>	95
1 mM CoCl <sub>2</sub>	34

## (10) Effet des agents tensioactifs:

On mesure l'effet des agents tensioactifs sur l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase.

	Agent tensioactif	Activité relative (%)
5	Témoin	100
	Triton X-100 à 0,1%	96
	Adékatol SO-145 à 0,1%	81
	Laurylbenzènesulfonate à 0,1%	0
	Laurylsulfate de sodium à 0,1%	0
10	Désoxycholate de sodium à 0,1%	2
	Chlorure de cétyltriméthylammonium à 0,1%	0
	Chlorure de cétylpyridinium à 0,1%	0

Comme il a été dit, l'enzyme multi-active de l'invention possède une activité d'énoyl-CoA-hydratase, une activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase et une activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase en une seule protéine enzymatique.

On trouvera ci-dessous un mode de réalisation de procédé de production d'une enzyme multi-active.

Les microorganismes utilisés pour la production de l'enzyme multi-active ne se limitent pas à Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701 mentionné ci-dessus, et l'on peut utiliser dans l'invention les autres souches appartenant au genre Pseudomonas produisant l'enzyme multi-active.

Dans un mode de réalisation préféré, on cultive les microorganismes producteurs d'enzyme multi-active appartenant à Pseudomonas dans un milieu classique pour la production d'enzyme. On peut utiliser une culture solide ou liquide pour la fermentation, cependant on préfère pour la production industrielle une culture aérobie en gélose profonde.

On peut utiliser les sources nutritives qui sont utilisées dans la culture classique des microorganismes. On peut utiliser des sources de carbone assimilable

comme le glucose, le saccharose, le lactose, l'amidon, le maltose, la dextrine, la mélasse et la glycérine. On peut également utiliser des sources d'azote assimilable comme la liqueur de maïs macérée, la poudre de soja, l'huile de graine de coton, le gluten de blé, la peptone, l'extrait animal, l'extrait de levure, la poudre de levure et l'hydrolysât de caséine. On peut utiliser si nécessaire des sels comme le phosphate, le sulfate, etc, de magnésium, de calcium, de potassium, de sodium, de zinc, de fer et de manganèse. Afin d'améliorer la productivité de l'enzyme multi-active, il peut être préférable d'ajouter au milieu des acides gras en C<sub>8</sub> à C<sub>20</sub> comme l'acide oléique, l'acide palmitique et l'acide stéarique.

On peut faire varier la température de culture pour cultiver les microorganismes et produire l'enzyme, cette température se situant à 26-32°C, de préférence à 30°C. La durée de la culture dépend des conditions employées et varie généralement entre 10 et 40 h. La culture doit naturellement être terminée lorsqu'on a obtenu le maximum d'activité enzymatique.

L'enzyme multi-active ainsi produite est contenue dans les cellules de microorganismes.

L'isolement de l'enzyme se fait de la façon suivante. Tout d'abord, on recueille les cellules cultivées par filtration ou centrifugation. On disloque les cellules par traitement aux ultra-sons, à la "presse française", traitement aux perles de verre ou traitement au lysozyme, et on peut éventuellement ajouter des agents tensioactifs comme le Triton X-100 (marque déposée) ou l'AdekatoI SO-145 (marque déposée).

On précipite l'enzyme en ajoutant un solvant organique miscible à l'eau comme le méthanol, l'éthanol ou l'acétone, et en relargant en ajoutant par exemple du chlorure d'ammonium. On purifie l'enzyme brute précipitée en dissolvant l'enzyme

brute, en dialysant avec un tube de cellophane, et on chromatographie en utilisant de la DEAE-cellulose, du DEAE-Sephadex, du CM-Sephadex ou une résine échangeuse d'ion, et on filtre sur gel avec Sephadex G-200, Sephadex CL-6B, 5 Sephacryl S-200 ou Toyopeal HW-60. On lyophilise l'enzyme obtenue pour obtenir l'enzyme multi-active purifiée.

La quantité d'enzyme utilisée dans un tel procédé enzymatique peut être une quantité suffisante pour la réaction enzymatique, et on la fait varier selon la quantité 10 et le nombre d'atomes de carbone de l'acide gras dans un spécimen, et cette quantité n'est donc pas limitée. Ainsi, lorsqu'on fait réagir un tel spécimen contenant 0,005-0,05  $\mu$ mole d'acide oléique en  $C_{18}$  à 37°C pendant 5 à 10 minutes, l'activité d'acyl-CoA-synthétase est généralement supérieure 15 à 1 U, de préférence de 5 à 15 U, et l'enzyme multiactif de l'invention dépasse habituellement 0,1 U, de préférence 1-25 U.

La quantité de réactifs dans les étapes réactionnelles, par exemple ATP ou GTP et CoASH dans le procédé (a), NAD 20 dans le procédé (d) et CoASH dans le procédé (e) doit être une quantité suffisante pour le produit de la quantité d'acide gras dans un échantillon et le nombre de cycles de  $\beta$ -oxydation selon le nombre de carbone dans ledit acide gras. Ainsi, dans le cas de 0,01  $\mu$ mole d'acide oléique, 25 la quantité d'ATP ou de GTP dépasse 0,1  $\mu$ mole, de préférence dépasse 0,5  $\mu$ mole; la quantité de CoASH dépasse 0,1  $\mu$ mole, de préférence dépasse 0,5  $\mu$ mole; et la quantité de NAD dépasse 0,1  $\mu$ mole, de préférence dépasse 0,5  $\mu$ mole.

Dans l'étape réactionnelle (b), l'action enzymatique 30 de l'acyl-CoA-oxydase est mise en oeuvre avec de l'oxygène dissous dans un échantillon, et dans l'étape (c), on peut utiliser de l'eau dans l'échantillon.

On peut utiliser un sel de magnésium soluble dans l'eau comme le chlorure de magnésium qui génère l'ion magnésium pour la réaction préférée de l'acyl-CoA-synthétase. Dans l'étape réactionnelle (b), il est préférable de retirer par l'action d'une catalase le peroxyde d'hydrogène généré par l'action d'une acyl-CoA-oxydase.

On peut préparer les composants pour le dosage dans lequel on trouve au moins de l'ATP ou du GTP et du CoASH, du NAD, une activité d'acyl-CoA-synthétase, une activité d'acyl-CoA-oxydase, une activité d'énoyl-CoA-hydratase, une activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase et une activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase.

Dans l'invention, on utilise de préférence l'enzyme multi-active ci-dessus. Comme il a été dit, on ajoute comme composants un sel de magnésium soluble dans l'eau, une catalase et un agent tensioactif non -ionique, comme le Triton X-100 (marque déposée). On prépare la solution en ajoutant de l'eau neutre à faible alcaline ou un tampon. En outre, dans le cas du dosage d'un ester d'acide gras, on ajoute dans les composants des agents libérant les acides gras comme une enzyme ou encore, dans le cas du dosage de l'activité d'une enzyme sur un ester d'acide gras, on ajoute au préalable dans les composants un ester d'acide gras. Ainsi, pour les composants du dosage de l'activité de lipase, on ajoute un glycéride, de préférence un monoglycéride ou un diglycéride dans les composants en vue de ce dosage. Il est préférable d'ajouter de l'albumine. Pour les composants du dosage d'un triglycéride, par exemple, ajoute une lipase.

On trouvera ci-dessous d'autres précisions sur les composants visant à un dosage.

Composants pour dosage d'activité de phospholipase  $A_1$ , d'activité de phospholipase  $A_2$  et d'activité de phospholipase B comprenant de la lécithine comme ester d'acide gras;

Composants pour dosage de l'activité de lysophospholipase

comprenant de la lysolécithine comme ester d'acide gras;

Composants pour dosage d'activité de phosphatase comprenant du phosphatidate comme ester d'acide gras et une activité de lipase;

5 Composants pour dosage d'activité de phospholipase C comprenant de la lécithine comme acide gras et une activité de lipase;

10 Composants pour dosage de l'activité de phospholipase D comprenant de la lécithine comme acide gras, une activité de phosphatidate phosphatase et une activité de lipase;

Composants pour dosage de l'activité de choline-estérase comprenant de l'acylcholine comme ester d'acide gras;

15 Composants pour dosage d'activité de cholestérol-estérase contenant un ester de stérol comme ester d'acide gras;

20 Composants pour dosage de lécithine comprenant une activité de phospholipase  $A_1$ , une activité de phospholipase  $A_2$ , une activité de phospholipase B, une activité de phospholipase C et une activité de lipase, ou une activité de phospholipase D et une activité de phosphatidate phosphatase et une activité de lipase;

Composants pour dosage de lysolécithine contenant une activité de lysophospholipase;

25 Composants pour dosage d'ester de cholestérol contenant une activité de cholestérol-estérase;

30 Composants pour dosage d'activité de lécithine - cholestérol-acyl-transférase contenant un ester d'acide gras de cholestérol et de lécithine, et une activité de cholestérol-estérase ou une activité de lysophospholipase; et

Composants pour dosage de cholestérol contenant de la lécithine comme ester d'acide gras, une activité de lécithine-cholestérol-acyl-transférase et une activité de cholestérol-estérase ou une activité de lysophospholipase.

On peut doser l'acide gras dans un échantillon en utilisant les composants pour le dosage ci-dessus. La quantité d'échantillon dépasse généralement 5  $\mu$ let on la mélange avec plus d'1 ml de la solution des composants pour le dosage. Le dosage est conduit de façon classique à 37°C. La durée d'incubation dépasse habituellement 1 minute; elle est de préférence de 5 à 10 minutes, et il est préférable qu'elle soit aussi longue que possible pour avoir une sensibilité plus élevée.

Le milieu servant au dosage est de préférence une solution tampon dans un intervalle de pH stable des enzymes, et est habituellement une solution faiblement acide ou alcaline comme l'eau, un tampon phosphaté à pH 6,5-8, un tampon Tris-HCl, un tampon imidazole-HCl, un tampon diméthylglutarate-NaOH, ou un tampon de Pipes-NaOH.

Après incubation, on détecte les modifications détectables de la réaction. Lesdits changements détectables signifient au moins une mole de composants consommée ou générée dans un cycle de  $\beta$ -oxydation.

Très classiquement, on détermine les changements de la quantité de NAD réduit à partir du NAD dans la réaction. On conduit la détection du NAD réduit en mesurant la capacité d'absorption spécifique du NAD réduit. Le NAD possède une absorption maximum à 260 nm, tandis que NAD réduit possède une absorption maximum à 260 et 340 nm, et donc on utilise une absorption à 320-360 nm, de préférence à 340 nm.

La poursuite de la détermination du NAD réduit est le procédé de dosage colorimétrique fondé sur la coloration d'un système de transfert électronique comme accepteur d'électrons pour le NAD réduit. Les modes de réalisation du réactif de coloration du système de transfert électronique sont un accepteur d'électrons, par exemple un sel de tétrazolium soluble dans l'eau comme INT, MTT, Néo-TB, NTB, TNTB et TB, et ceux-ci sont utilisés de préférence avec de la

diaphorase et du méthosulfate de phénazine pour améliorer le transport électronique. Le réactif de transfert électronique peut être préalablement ajouté dans les composants pour le dosage ci-dessus, ou peut être ajouté après la réaction.

5 On fait réagir le NAD réduit formé dans la réaction avec les réactifs de transfert électronique pour former un changement de couleur que l'on peut mesurer à sa longueur d'onde d'absorption.

10 Un autre mode de réalisation du dosage du NAD réduit consiste à doser le NAD réduit en utilisant une enzyme comme la NAD réduite-oxydase. Ladite enzyme, pour laquelle le NAD réduit est un substrat, est de préférence immobilisée par une technique d'immobilisation classique antérieurement connue.

15 Ladite enzyme immobilisée est assemblée dans l'électrode à oxygène pour préparer l'électrode à NAD réduit-oxydase.

On peut mesurer électriquement la quantité d'oxygène consommée à partir du NAD réduit qui est généré pendant la réaction.

20 On peut déterminer la quantité d'acide gras sur la base de la quantité de NAD réduit ainsi formé. On peut mesurer une autre quantité d'ester d'acide gras ou d'activité enzymatique dans un échantillon par ladite quantité d'acide gras.

25 On peut également doser le réactif consommé comme le CoASH ou l'acyl-CoA généré, en tant que changements détectables.

30 Le procédé de dosage et les composants pour dosage de l'invention ci-dessus sont utiles avec une sensibilité simple et élevée et peuvent, par exemple, être appliqués pour le dosage de l'activité de lipase dans les diagnostics cliniques de la fonction pancréatique.

Les procédés de dosage de l'acyl-CoA-synthétase et de l'acyl-CoA-oxydase utilisés dans l'invention sont présentés ci-dessous.

(1) Procédé de dosage de l'activité d'acyl-CoA-synthétase:

5	(I) Mélange réactionnel I:	
	Tampon phosphaté 0,2 M (pH 7,5)	0,2 ml
	ATP 10 mM	0,1 ml
	MgCl <sub>2</sub> 10 mM	0,1 ml
	CoASH 10 mM	0,05 ml
10	Triton X-100 à 5% contenant une solution d'acide palmitique 1 mM	0,2 ml
	Eau distillée	0,35 ml
	Total:	1,00 ml

(II) Mélange réactionnel II:

15	Tampon phosphaté 0,2 M (pH 7,5)	0,5 ml
	N-éthylmaléimide 20 mM	0,1 ml
	4-aminoantipyrine 15 mM	0,3 ml
	3-méthyl-N-éthyl-N-(β-hydroxyéthyl) (β-hydroxyéthyl)aniline à 0,3%	0,25 ml
20	Peroxydase (100 PPU/ml)	0,1 ml
	Azide de sodium à 0,5%	0,1 ml
	Acyl-CoA-oxydase (120 U/ml)	0,1 ml
	Eau distillée	0,55 ml
	Total	2,00 ml

25 On ajoute la solution enzymatique (50 µl) au mélange réactionnel I et on fait incuber à 37°C pendant 10 minutes. On y ajoute le mélange réactionnel II, on fait incuber à 37°C pendant 5 minutes et on mesure la capacité d'absorption à 550 nm ( $\Delta A_{550}$ ).

30 L'activité enzymatique est définie dans l'équation suivante:

$$\text{Activité enzymatique (U/mg)} = \frac{\Delta A_{550}/10}{32,0 \times 1/2} \times \frac{3,05}{0,05} \times C^*$$

C\*: concentration d'acyl-CoA-synthétase dans une solution enzymatique (mg/ml).

(2) Procédé de dosage de l'activité d'acyl-CoA-oxydase:

5	Tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)	0,1 ml
	4-aminoantipyrine 5 mM	0,05 ml
	Diéthylmétatoluidine 3 mM	0,05 ml
	Peroxydase 0,5 mg/ml	0,05 ml
	Palmitoyl-CoA 25 mM	0,02 ml
10	Eau distillée	0,23 ml
	Total	0,50 ml

On ajoute la solution enzymatique (10 µl) au mélange réactionnel ci-dessus et on fait incuber à 37°C pendant 10 minutes. On arrête la réaction en ajoutant de l'urée 4 M (0,5 ml), on ajoute du Triton X-100 à 1% (2 ml) et on mesure par colorimétrie à 545 nm pour mesurer la quantité de peroxyde d'hydrogène formée. On définit une unité enzymatique (1 U) comme la quantité d'enzyme qui génère 1 µmole de peroxyde d'hydrogène en une minute.

20 Les exemples suivants précisent l'invention mais ne sont pas conçus comme limitatifs.

#### Exemple 1

Production d'enzyme multi-active :

25 Dans un erlenmeyer de 500 ml on ajoute un milieu (100 ml) comprenant de la peptone à 1,5%, de l'extrait de levure en poudre à 0,5%, du KCl à 0,2%, du NaCl à 0,1%, du  $K_2HPO_4$  à 0,1%, du  $MgSO_4$  à 0,05% et de l'acide oléique à 0,75%, pH 7,5. On stérilise au total à 120°C 15 flacons

contenant les mêmes milieux ci-dessus et on inocule Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701 à 30°C que l'on cultive en agitant pendant 20 h dans un agitateur rotatif. On centrifuge le milieu combiné à 5000 tpm pendant 20 minutes pour obtenir des cellules bactériennes. On ajoute les cellules à une solution de lysozyme (360 ml, 1,50 mg dans un tampon phosphaté 10 mM, pH 7,0) pour obtenir une solution brute d'enzyme multi-active (340 ml, activité spécifique: 3,0 U/mg comme activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase).

L'isolement et la purification de l'enzyme se font de la façon suivante.

On ajoute de l'acétone préalablement refroidie (-20°C, 290 ml) à une solution d'enzyme multi-active brute (290 ml) refroidie dans un bain glacé et on recueille le précipité. On dissout le précipité dans un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) contenant du KCl 1 M et on centrifuge à 12 000 tpm pendant 10 minutes pour retirer les fractions insolubles. On recueille la solution surnageante (45 ml) et on y ajoute une solution saturée de sulfate d'ammonium (22,5 ml, pH 7,0). On retire le précipité par centrifugation à 12 000 tpm pendant 10 minutes. On ajoute une solution saturée de sulfate d'ammonium (28 ml) au surnageant (57 ml). On dissout le précipité dans un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) contenant du KCl 1 M et on dialyse en utilisant un tube de cellophane contre un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,5, 2,0 litres) à 4°C pendant 20 h. On lyophilise le dialysat pour obtenir une poudre d'enzyme multi-active (77 mg) présentant une activité spécifique de 18,2 U/mg sous forme d'activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase.

On introduit l'enzyme (77 mg) dissoute dans 20 ml d'eau dans une colonne (3 x 11 cm) de DEAE-Sephalose CL-6B (Farmacia Co.) équilibrée avec un tampon Tris-HCl 10 mM et on lave avec le même tampon. On conduit l'élution par gradient linéaire avec 500 ml de tampon Tris-HCl 10 mM

et le même tampon contenant du KCl 0,4 M, à un rythme d'élu-  
tion de 52 ml/heure. On recueille des fractions de 9 ml chacune et on obtient les fractions actives n° 71-80 (90 ml) présentant une activité spécifique de 30,0 U/mg sous forme d'activité de 3-hydroxy-acyl-CoA-déshydrogénase. On dialyse la fraction active contre une solution de tampon phosphaté 10 mM (pH 7,5, 2 litres) et on l'introduit dans une colonne (2 x 10 cm) remplie de gel d'hydroxyapatite. On conduit l'élu-  
tion par gradient linéaire avec 300 ml de tampon phosphaté 10 mM (pH 7,5) et 300 ml de tampon phosphaté 0,5 M (pH 7,5) , avec un débit d'élu-  
tion de 33 ml/heure. On recueille des fractions de 5 ml chacune et on obtient les fractions actives (n° 46-62, 85 ml) (activité d'énoylacyl-CoA-hydratase: 210,3 U/mg, activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase: 105 U/mg, activité de 3-cétoacyl-CoA-thio-  
lase : 85,6 U/mg), que l'on concentre par ultra-filtration (Amicon Co. XM-50). On introduit le concentré sur une colonne (1,1 x 90 cm) remplie de Toyopeal HW-60 (Toyo Soda Co.) et on filtre sur gel avec un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 contenant du KCl 0,5 M. On recueille des fractions de 3,5 ml chacune et on obtient les fractions actives n° 23-27 (17,5 ml). On lyophilise la solution pour obtenir l'enzyme multi-active purifiée (20 mg, 1110 U/mg sous forme de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase).

## 25 Exemple 2

On introduit le même milieu (30 litres) que dans l'exemple 1 (auquel on ajoute l'anti-mousse silicon KM-72, Shinetsu Chem. Co.) dans un récipient de fermentation de 30 litres et on stérilise à 120°C pendant 20 minutes. On inocule un milieu cultivé (500 ml) de Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701, et on cultive à 30°C, 300 rpm, 20 l/minute pendant 17 heures. On centrifuge le milieu cultivé pour obtenir les cellules cultivées. On traite les cellules

avec du lysozyme (3 g) dans un tampon phosphaté 10 mM (pH 7,0) pour obtenir la solution d'enzyme multi-active (6 litres) (15,6 U/ml sous forme d'activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase).

5 Exemple 3

Détermination quantitative de divers acides gras:

Composition pour dosage:

	Tampon de Pipes-NaOH 0,2 M (pH 7,3)	0,5 ml
	NAD 10 mM	0,2 ml
10	MgCl <sub>2</sub> 10 mM	0,3 ml
	ATP 10 mM	0,3 ml
	Triton X-100 à 3%	0,1 ml
	CoASH 10 mM	0,2 ml
15	Solution d'acyl-CoA6synthétase (40 U/ml, Toyo Jozo Co.)	0,02 ml
	Acyl-CoA-oxydase (400 U/ml)	0,02 ml
	Catalase (150 U/ml); Sigma Chem. Co.)	0,05 ml
20	Enzyme multi-active (activité d'énoyl-CoA-hydratase: 400 U/ml; activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogé- nase: 200 U/ml; activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase: 163 U/ml)	0,05 ml
	Eau distillée	1,26 ml
25	Total	<hr/> 3,00 ml

On ajoute un échantillon (25 µl) contenant 3 mM/ml d'acide gras (0,05 µmole) à la composition pour dosage ci-dessus (3,00 ml), on fait incuber à 37°C pendant 5 minutes, et on mesure la quantité de NAD réduit par absorption à 340 nm (DO<sub>340 nm</sub>). Les résultats sont donnés au Tableau 3. Comme le montre le Tableau, la densité optique à 340 nm est proportionnelle au nombre de carbones des acides gras dans l'échantillon.

Exemple 4

Dosage quantitatif de l'acide oléique:

On ajoute un échantillon (20  $\mu$ l) contenant de l'acide oléique (respectivement 0,01  $\mu$ mole, 0,02  $\mu$ mole, 0,03  $\mu$ mole, 0,04  $\mu$ mole et 0,05  $\mu$ mole) à la composition pour dosage (3,00 ml) de l'exemple 3, on fait incuber à 37°C pendant 5 minutes, et on mesure la quantité de NAD réduit par l'absorption à 340 nm. Le résultat est donné dans la figure 4 (●-●). Dans la figure 4, (○-○) désigne le dosage témoin selon un procédé donné dans Anal. Biochem., 98, 341 (1979).

Comme le montre la figure 4, le procédé de dosage de l'invention est supérieur en sensibilité par rapport aux procédés de dosage classiques antérieurs.

Table 3.

Acide gras	nombre de carbones (nombre d'insaturations)	D O <sub>340 nm</sub>
Acide caproïque	6 (0)	0,089
Acide caprylique	8 (0)	0,175
Acide caprique	10 (0)	0,267
Acide laurique	12 (0)	0,356
Acide myristique	14 (0)	0,444
Acide palmitique	16 (0)	0,530
Acide palmitoléique	16 (1)	0,529
Acide stéarique	18 (0)	0,622
Acide oléique	18 (1)	0,628
Acide linolique	18 (2)	0,619
Acide linoléique	18 (3)	0,630

Exemple 5

Dosage de l'acide oléique:

Composition pour dosage:

	Tampon Pipes-NaOH 0,2 M (pH 7,3)	0,5 ml
5	NAD 10 mM	0,2 ml
	MgCl <sub>2</sub> 10 mM	0,2 ml
	ATP 10 mM	0,2 ml
	Triton X-100 à 1%	0,2 ml
	CoASH 10 mM	0,2 ml
10	Acyl-CoA-synthétase (40 U/ml)	0,02 ml
	Acyl-CoA-oxydase (400 U/ml)	0,02 ml
	Enzyme multi-active (énoyl-CoA-hydratase: 400 U/ml, 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase: 200 U/ml, 3-cétoacyl-CoA-thiolase: 163 U/ml)	0,01 ml
15	Catalase (150 U/ml)	0,05 ml
	Diaphorase (30 U/ml, Toyo Jozo Co.)	0,1 ml
	NTB à 0,25%	0,2 ml
20	Eau distillée	1,10 ml
	Total	3,00 ml

On ajoute des échantillons (20 µl) contenant de l'acide oléique (0,005 µmole, 0,01 µmole, 0,015 µmole, 0,02 µmole et 0,025 µmole, respectivement) à la composition pour dosage ci-dessus (3,00 ml) et on fait incuber à 37°C pendant 10 minutes.

On mesure l'absorption à 550 nm de la coloration bleue-violet formée correspondant à la quantité de NAD réduit produite selon la réaction ( $DO_{550 \text{ nm}}$ ). Le résultat est donné dans la figure 5 (●-●). Dans la figure 5, (o-o) montre le dosage témoin selon le procédé d'Anal. Biochem. 108, 6 (1980) [absorption à 505 nm,  $DO_{505 \text{ nm}}$ ].

Les résultats témoignent d'un procédé de dosage très sensible par rapport à la technique antérieure.

Exemple 6

Dosage de l'activité de lipase (lipase sérique):

5	Composition pour dosage:	
	Tampon Pipes-NaOH 0,2 M (pH 7,3)	0,2 ml
	NAD 10 mM	0,15 ml
	MgCl <sub>2</sub> 10 mM	0,15 ml
	ATP 10 mM	0,15 ml
10	Triton X-100 à 2% contenant 10 mM de 1,2-dioléylglycéride	0,10 ml
	CoASH 10 mM	0,15 ml
	KCl 2 M	0,1 ml
	Sérum albumine de boeuf à 5%	0,1 ml
15	Acyl-CoA-synthétase (40 U/ml)	0,2 ml
	Acyl-CoA-oxydase (400 U/ml)	0,02 ml
	Enzyme multi-active (énoyl-CoA-hydratase: 400 U/ml,	
20	3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase: 200 U/ml,	
	3-cétoacyl-CoA-thioalse: 163 U/ml)	0,05 ml
	Catalase 150 U/ml	0,05 ml
	Eau distillée	0,08 ml
		<hr/>
	Total	1,5 ml

25 On mélange la composition pour dosage ci-dessus (1,5 ml) avec du sérum humain (50 µl), on fait incuber à 37°C et on mesure de façon continue la formation de NAD réduit à 340 nm. Le résultat est donné au tableau 4.

Tableau 4

Durée de réaction(min.)	D O <sub>340 nm</sub>
0	0, 1 2 0
3	0, 3 7 7
5	0, 4 0 0
7	0, 4 1 2
8	0, 4 2 0
13	0, 4 7 6

Selon le résultat ci-dessus, il est clair que l'acide gras dans le sérum a réagi avant la réaction de l'acide gras libéré à partir du diglycéride par action de la lipase sérique, et que la réaction de l'acide gras libre dans le sérum est terminée au bout de 7 minutes. L'augmentation de l'absorption au bout de ce temps est fondée sur le NAD réduit qui se forme à partir de la  $\beta$ -oxydation de l'acide gras libéré à partir du diglycéride par l'action de la lipase sérique. L'activité de lipase mesurée par un accroissement de l'absorption pendant un intervalle de 5 minutes entre 8 et 13 minutes est donc de 3,44 U/l.

On mesure l'activité de lipase selon l'équation suivante:

$$\text{Activité de lipase (U/l.)} = \Delta DO^* \times \frac{1}{6,2 \times \text{nombre de cycles } \beta} \\ \times \frac{1}{1,5} \times \frac{1000}{50} \times \frac{1}{5} \times 1000$$

\* $\Delta DO$  désigne la différence entre la  $DO_{340 \text{ nm}}$  au bout de 13 minutes de réaction et la  $DO_{340 \text{ nm}}$  au bout de 8 minutes de réaction. Le nombre de cycles de  $\beta$ -oxydation est de 7.

5 Dans le dosage de la lipase sérique, on prépare la composition pour dosage sans ajouter de glycéride, et on y ajoute des échantillons pour dosage de la lipase sérique pour annuler l'effet de l'acide gras libre dans le sérum, puis on peut doser l'activité de lipase en ajoutant le compo-  
10 sition pour dosage ci-dessus sans affecter l'acide gras libre sérique.

#### Exemple 7

Composition pour dosage des triglycérides:

	Tampon phosphaté 0,2 M (pH 7,5)	0,5 ml
	NAD 10 mM	0,3 ml
15	$MgCl_2$ 10 mM	0,4 ml
	ATP 10 mM	0,3 ml
	Triton X-100 à 3%	0,1 ml
	CoASH 10 mM	0,4 ml
	Acyl-CoA-synthétase (40 U/ml)	0,03 ml
20	Acyl-CoA-oxydase (400 U/ml)	0,03 ml
	Enzyme multi-active (énoyl-CoA-hydratase: 400 U/ml, 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase: 200 U/ml, 25 3-cétoacyl-CoA-thiolase: 163 U/ml)	0,07 ml
	Catalase (150 U/ml)	0,07 ml
	Lipase (10 000 U/ml, Toyo Jozo Co.)	0,03 ml
	Eau distillée	0,77 ml
	Total	3,00 ml

30 La composition pour dosage des triglycérides peut être utilisée comme suit.

On ajoute le sérum (30  $\mu$ l) à la même composition pour dosage que dans l'exemple 3, qui est utile pour annuler l'effet de l'acide gras libre sérique, on fait incubé à

37°C pendant 10 minutes et on recueille l'échantillon (1 ml, correspondant à 10 µl dans le sérum). On mélange ledit échantillon avec la composition pour dosage des triglycérides ci-dessus et on mesure l'augmentation de l'absorption à 340 nm. Ou encore on mélange directement la composition pour triglycéride avec le sérum (10 µl) et on mesure l'augmentation d'absorption à 340 nm au bout de 10 minutes de réaction.

#### Exemple 8

Composition pour dosage de l'activité de phospholipase A<sub>1</sub>, de l'activité de phospholipase A<sub>2</sub> ou de l'activité de phospholipase B:

Dans l'exemple 3, on remplace l'eau distillée (1,26 ml) dans la composition pour dosage par une solution de lécithine 10 mM (0,2 ml) et d'eau distillée (1,06 ml) pour préparer la composition pour doser les activités enzymatiques ci-dessus.

#### Exemple 9

Composition pour dosage de l'activité de lysophospholipase:

Dans l'exemple 3, on remplace l'eau distillée (1,26 ml) par une solution de lysolécithine 10 mM (0,2 ml) et d'eau distillée (1,06 ml) pour préparer la composition pour doser l'activité de lysophospholipase.

#### Exemple 10

Composition pour dosage de l'activité de phosphatase:

Dans l'exemple 3, on remplace l'eau distillée (1,26 ml) par une solution de phosphatidate 10 mM (0,2 ml), de lipase (10 000 U/ml, 0,05 ml) et d'eau distillée (1,01 ml) pour préparer la composition pour doser l'activité de phosphatase.

Exemple 11

Composition pour dosage de l'activité de phospholipase C:

5 Dans l'exemple 7, on remplace l'eau distillée (0,77 ml) dans la composition pour dosage des triglycérides par une solution de lécithine 10 mM (0,2 ml) et d'eau distillée (0,57 ml) pour préparer la composition pour l'activité de phospholipase C.

10 Ladite composition est également affectée par les glycérides et donc lorsqu'on utilise un échantillon contenant un glycéride, il faut déduire la quantité d'acide gras provenant du glycéride.

Exemple 12

Composition pour dosage de l'activité de phospholipase C:

15 On prépare une composition pour une réaction de libération d'acide gras (2,0 ml) comprenant une solution de lécithine 10 mM (0,2 ml), de la lipase (5 000 U/ml, 0,08 ml), une solution de tampon phosphaté 0,2 M (pH 7,5, 0,50 ml) et d'eau distillée (1,22 ml).

20 On dispose ladite composition et la composition pour dosage de l'exemple 3 pour doser l'activité de phospholipase C.

25 On ajoute la composition pour la réaction libérant l'acide gras (2,0 ml) à l'échantillon contenant la phospholipase C (20  $\mu$ l) et on fait incuber à 37°C pendant 10 minutes. On y ajoute la composition (3,00 ml) de l'exemple 3, on fait incuber à 37°C pendant 5 minutes, et on mesure l'absorption à 340 nm.

Exemple 13

30 Composition pour dosage de l'activité de phospholipase D:

On prépare une composition pour la réaction libérant

l'acide gras (2,0 ml) comprenant une solution de lécithine 10 mM (0,2 ml), de la phosphatidate phosphatase (50 U/ml, Toyo Jozo Co., 0,05 ml), de la lipase (10 000 U/ml, 0,05 ml), du tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 7,5, 0,6 ml) et de l'eau distillée (1,1 ml). On utilise ladite composition avec la composition de l'exemple 3 pour la composition pour dosage de la phospholipase D.

#### Exemple 14

Composition pour dosage de l'activité de choline estérase:

Dans l'exemple 3, on remplace l'eau distillée (1,26 ml) par une solution 2 mM d'ester de palmitoyl-choline (0,2 ml) et d'eau distillée (1,06 ml) pour préparer la composition pour dosage de l'activité de choline estérase.

#### Exemple 15

Composition pour dosage de l'activité de cholestérol estérase:

Dans l'exemple 3, on remplace l'eau distillée (1,26 ml) par une solution 5 mM d'ester de 3-oléoyl-cholestérol (0,2 ml) et d'eau distillée (1,06 ml) pour préparer la composition pour dosage de l'activité de cholestérol estérase.

#### Exemple 16

Composition pour dosage de l'activité de lécithine-cholestérol-acyl-transférase:

On prépare une composition pour réaction de libération d'acide gras (2,0 ml) comprenant une solution de cholestérol 5 mM (0,2 ml), une solution de lécithine 5 mM (0,2 ml), de la lysophospholipase (80 U/ml, 0,05 ml) et du TRiton X-100 à 0,3% dans un tampon phosphaté 0,1 M (pH 7,5, 1,55 ml).

On utilise ladite composition avec la composition de l'exemple 3 pour doser l'activité de lécithine-cholestérol-

acyl-transférase.

Exemple 17

Composition pour dosage de l'ester de cholestérol:

Dans l'exemple 3, on remplace l'eau distillée (1,26 ml)  
5 par la cholestérol estérase (350 U/ml, Toyo Jozo Co., 0,2 ml)  
et de l'eau distillée (1,06 ml) pour préparer la composition  
pour dosage de l'ester de cholestérol.

[Exemple de production d'acyl-CoA oxydase]:

On introduit dans un tube à essais après stérilisation  
10 un milieu (10 ml) contenant de l'acide oléique à 1%, de l'ex-  
trait de levure à 0,25%, de la peptone à 1%, KCl à 0,2%,  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 0,1%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O à 0,05% et un anti-mousse (Disfoam  
BC-51Y) à 0,2%. On inocule Arthrobacter sp. B-0720 PERM-P  
N° 5224 et on cultive à 30°C pendant la nuit tout en agitant.

15 On transfère ladite culture dans le même milieu (5 l)  
dans un récipient de fermentation de 8 l et on conduit une  
culture aérobie submergée à 30°C pendant 20 h, à 600 tpm  
en aérant à raison de 5 l/min. On recueille les cellules  
cultivées par centrifugation et on les met en suspension  
20 dans un tampon phosphaté 10 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM et 0,5  
mg/ml de lysozyme, puis on agite à 37°C pendant 60 minutes.  
On y ajoute de la DNA-ase (5 mg), on agite pendant 10 minutes  
et on centrifuge à 10 000 tpm pendant 20 minutes.

25 On ajoute de l'acétone (200 ml) au surnageant, on  
centrifuge et on ajoute à nouveau l'acétone (1,8 litre). On  
dissout le précipité obtenu par centrifugation dans un tampon  
phosphaté 10 mM (pH 7,0, 200 ml). On retire les fractions  
insolubles par centrifugation et on ajoute une solution  
saturée de sulfate d'ammonium au surnageant à 30-75% de  
30 saturation. On dessale le précipité dissous dans un tampon  
phosphaté 10 mM (pH 7,0, 40 ml) en l'introduisant dans une  
colonne de gel d'acrylamide (Biogel P-2, Biorad Co.).

On l'introduit ensuite dans une colonne de gel de phosphate de calcium, on lave et on élue par élution à gradient linéaire avec un tampon phosphaté 0,05-0,5 M (pH 7,0). On recueille les fractions actives (environ 0,45 M), on concentre par ultrafiltration (membrane Diaflow PM-10, Amicon Co.), et on lyophilise pour obtenir l'acyl-CoA oxydase (activité spécifique: 5,5 U/mg, activité totale: 850 U, rendement: 8,5%).

4. Brève légende des dessins:

- 10 Fig. 1: pH optimum de l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase dans l'enzyme multi-active préparée à partir du Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701.
- 15 Fig. 2: stabilité du pH de l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase dans l'enzyme multi-active
- Fig. 3: stabilité à la chaleur de l'activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase dans l'enzyme multi-active.
- 20 Fig. 4: Courbe de dosage standard de l'acide oléique.
- Fig. 5: courbe de dosage standard de l'acide oléique.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de dosage d'un composant dans un échantillon comprenant les procédés suivants:

5 (a) un procédé réactionnel pour transformer l'acide gras en acyl-CoA;

(b) un procédé réactionnel pour transformer l'acyl-CoA en déshydro-acyl-CoA;

(c) un procédé réactionnel pour transformer le déshydroacyl-CoA en hydroxyacyl-CoA;

10 (d) un procédé réactionnel pour transformer l'hydroxyacyl-CoA en cétoacyl-CoA; et

(e) un procédé réactionnel pour transformer le cétoacyl-CoA en acyl-CoA, et le procédé pour mesurer les changements détectables.

15 2. Procédé de dosage selon la revendication 1 où lesdits procédés réactionnels sont:

(a) un procédé réactionnel comprenant un acide gras, CoASH, ATP ou GTP et une activité d'acyl-CoA-synthétase;

20 (b) un procédé réactionnel comprenant un acyl-CoA, de l'oxygène, et une activité d'acyl-CoA oxydase;

(c) un procédé réactionnel comprenant un déshydroacyl-CoA, de l'eau et une activité d'énoyl-CoA hydratase;

(d) un procédé réactionnel comprenant un hydroxyacyl-CoA, du NAD et une activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase; et

25 (e) un procédé réactionnel comprenant un cétoacyl-CoA, du CoASH et une activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase.

30 3. Procédé de dosage selon l'une des revendications 1 ou 2, où lesdits procédés réactionnels (c), (d) et (e) sont fondés sur l'activité enzymatique de l'enzyme multi-active comprenant une activité d'énoyl-CoA-hydratase, une activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase et une activité de

3-cétoacyl-CoA-thiolase dans une seule protéine enzymatique.

4. Procédé de dosage selon la revendication 3 où ladite enzyme multi-active est une enzyme obtenue à partir de micro-organismes producteurs d'enzyme multi-active de souche appartenant à Pseudomonas fragi.

5. Procédé de dosage selon la revendication 4 où ladite souche productrice d'enzyme multi-active appartenant à Pseudomonas fragi est Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701.

6. Procédé de dosage selon l'une des revendications 1, 2 ou 3, où ledit procédé pour mesurer les changements détectables est un procédé de détermination quantitative de la quantité de NAD réduit qui se forme dans le procédé réactionnel.

7. Procédé de dosage selon la revendication 6 où ladite détermination quantitative de la quantité de NAD réduit est conduite non par une longueur d'onde d'absorption spécifique du NAD mais par une longueur d'onde dans la région de la longueur d'onde d'absorption spécifique du NAD réduit.

8. Procédé de dosage selon la revendication 7, où ladite longueur d'onde dans la région de longueur d'onde d'absorption est d'environ 320 nm-360 nm.

9. Procédé de dosage selon la revendication 8 où ladite longueur d'onde dans la région de longueur d'onde d'absorption est d'environ 340 nm.

10. Procédé de dosage selon la revendication 7 où ladite détermination quantitative de la quantité de NAD réduit est conduite par colorimétrie du chromogène de transfert d'atome d'hydrogène, accepteur d'atome d'hydrogène du NAD réduit.

11. Procédé de dosage selon la revendication 10 où ledit chromogène de transfert d'atome d'hydrogène, accepteur d'atome d'hydrogène du NAD réduit, est un système de transfert d'atome d'hydrogène qui contient une diaphorase et un sel de tétrazolium soluble dans l'eau.
- 5
12. Procédé de dosage selon l'une des revendications 1 à 11 où le composant dans l'échantillon à doser est un acide gras.
13. Procédé de dosage selon la revendication 12 où ledit acide gras dans l'échantillon à doser est un acide gras libéré à partir d'un échantillon contenant un ester d'acide gras par activité enzymatique qui génère un acide gras à partir d'un ester d'acide gras.
- 10
14. Procédé de dosage selon la revendication 13 où ledit dosage est soit un dosage d'ester d'acide gras, soit un dosage d'activité enzymatique.
- 15
15. Procédé de dosage selon l'une des revendications 13 ou 14 où ledit ester d'acide gras est un monoglycéride, un diglycéride ou un triglycéride, et où l'activité enzymatique est une activité de lipase.
- 20
16. Procédé de dosage selon la revendication 15 où ledit dosage d'activité de lipase est conduit en ajoutant de l'albumine.
17. Procédé de dosage selon l'une des revendications 13 ou 14 où ledit acide gras est la lécithine et où l'activité enzymatique est l'activité de phospholipase A<sub>1</sub>, l'activité de phospholipase A<sub>2</sub> ou l'activité de phospholipase B.
- 25
18. Procédé de dosage selon l'une des revendications 13 ou

- 14 où ledit ester d'acide gras est la lysolécithine et l'activité enzymatique est une activité de lysophospholipase.
- 5 19. Procédé de dosage selon l'une des revendications 13 ou 14 où ledit ester d'acide gras est l'acide phosphatidique et où l'activité enzymatique est l'activité d'acide phosphatidique-phosphatase et l'activité de lipase.
- 10 20. Procédé de dosage selon l'une des revendications 13 ou 14 où ledit ester d'acide gras est la lécithine et où l'activité enzymatique est l'activité de phospholipase C et l'activité de lipase.
- 15 21. Procédé de dosage selon l'une des revendications 13 ou 14 où ledit ester d'acide gras est la lécithine et où l'activité enzymatique est l'activité de phospholipase D, l'activité d'acide phosphatidique -phosphatase et l'activité de lipase.
22. Procédé de dosage selon l'une des revendications 13 ou 14 où ledit ester d'acide gras est l'acylcholine et où l'activité enzymatique est l'activité de choline estérase.
- 20 23. Procédé de dosage selon l'une des revendications 13 ou 14 où ledit ester d'acide gras est l'ester de stérol et où l'activité enzymatique est l'activité de cholestérol-estérase.
- 25 24. Procédé de dosage selon l'une des revendications 1 à 11 où ledit acide gras est libéré à partir d'un échantillon comprenant de la lécithine et du cholestérol par une activité de lécithine:activité de cholestérol acyltransférase ou activité de lysophospholipase.

25. Procédé de dosage selon la revendication 24 où ledit dosage est conçu pour doser la lécithine, le cholestérol ou une activité enzymatique.

26. Composition pour dosage comprenant au moins :

- 5
- ATP ou GTP,
  - CoASH,
  - NAD,
  - Activité d'acyl-CoA-synthétase,
  - Activité d'acyl-CoA-oxydase,

10

  - Activité d'énoyl-CoA-hydratase,
  - Activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase, et
  - Activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase.

27. Composition pour dosage selon la revendication 26 où ladite composition contient un sel de magnésium soluble dans l'eau qui génère l'ion magnésium.

15

28. Composition pour dosage selon l'une des revendications 26 ou 27 comprenant une composition pour doser un acide gras.

29. Composition pour dosage selon l'une des revendications 26 ou 27 où ladite composition pour dosage implique au moins de contenir un ester d'acide gras ou une activité enzymatique qui génère l'acide gras à partir de l'ester d'acide gras, et une composition pour doser l'un quelconque des composants dudit ester d'acide gras et ladite activité enzymatique.

20

30. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'activité de lipase comprenant un monoglycéride, un diglycéride ou un triglycéride comme ester d'acide gras.

25

31. Composition pour dosage selon la revendication 30 où

ladite composition pour doser la lipase contient de l'albumine.

5 32. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser un ester d'acide gras comprenant l'activité enzymatique de la lipase.

33. Composition pour dosage selon la revendication 32 comprenant une composition pour doser un triglycéride.

10 34. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'activité de phospholipase  $A_1$ , l'activité de phospholipase  $A_2$  ou l'activité de phospholipase B comprenant de la lécithine comme ester d'acide gras.

15 35. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'activité de lysophospholipase comprenant de lysolécithine comme ester d'acide gras.

20 36. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'activité d'acide phosphatidique-phosphatase comprenant l'acide phosphatidique comme ester d'acide gras.

25 37. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'activité de phospholipase C comprenant la lécithine comme ester d'acide gras et la lipase comme activité enzymatique.

38. Composition pour dosage selon la revendication 29 où

ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'activité de phospholipase D comprenant la lécithine comme ester d'acide gras et la phosphatase d'acide phosphatidique et la lipase comme activités enzymatiques.

- 5 39. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'activité de choline-estérase comprenant l'acetylcholine comme ester d'acide gras.
- 10 40. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'activité de cholestérol-estérase comprenant l'ester de cholestérol comme ester d'acide gras.
- 15 41. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser la lécithine comprenant les activités enzymatiques de la phospholipase A<sub>1</sub>, de la phospholipase A<sub>2</sub>, de la phospholipase B, de la phospholipase C et de la lipase, ou les activités enzymatiques de la phospholipase D, de l'acide phosphatidique-phosphatase et de la lipase.
- 20 42. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser l'ester de cholestérol comprenant l'activité enzymatique de la cholestérol-estérase.
- 25 43. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser la lécithine: activité de cholestérol acyltransférase comprenant du cholestérol et de la lécithine comme esters d'acide gras et l'activité enzymatique de la cholestérol-estérase ou de la lysophospholipase.

44. Composition pour dosage selon la revendication 29 où ladite composition pour dosage est une composition pour doser le cholestérol comprenant la lécithine comme ester d'acide gras, et les activités enzymatiques de la lécithine: cholestérol acyltransférase et de la cholestérol-estérase ou de la lysophospholipase.
45. Composition pour dosage selon l'une des revendications 26 à 44 où l'activité enzymatique est une enzyme multi-actives comprenant une activité d'énoyl-CoA hydratase, une activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase et une activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase dans une seule protéine enzymatique.
46. Composition pour dosage selon la revendication 45 où ladite enzyme multi-active est une enzyme obtenue à partir d'un micro-organisme producteur d'enzyme multi-active appartenant à Pseudomonas fragi.
47. Composition pour dosage selon la revendication 46 où ladite souche productrice d'enzyme multi-active est Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701.
48. Composition pour dosage selon l'une des revendications 26 à 47 où ladite composition pour dosage contient un chromogène de transfert d'atome d'hydrogène, accepteur d'atome d'hydrogène du NAD réduit.
49. Composition pour dosage selon la revendication 48 où ledit chromogène de transfert d'atome d'hydrogène comprend la diaphorase et un sel de tétrazolium soluble dans l'eau.
50. Procédé de production d'une enzyme dans lequel on cultive des microorganismes appartenant au genre Pseudomonas

produisant une enzyme ayant une activité d'énoyl-CoA-hydratase, une activité de 3-hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase et une activité de 3-cétoacyl-CoA-thiolase, et on isole l'enzyme à partir de ces microorganismes.

5 51. Procédé selon la revendication 50 où ledit microorganisme est une souche appartenant à Pseudomonas fragi.

52. Procédé selon la revendication 51 où ledit microorganisme est Pseudomonas fragi B-0771 FERM-P n° 5701.

FIG. 1

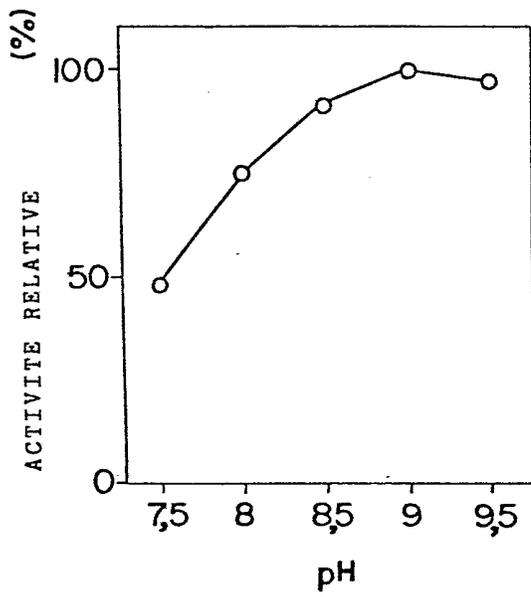


FIG. 2

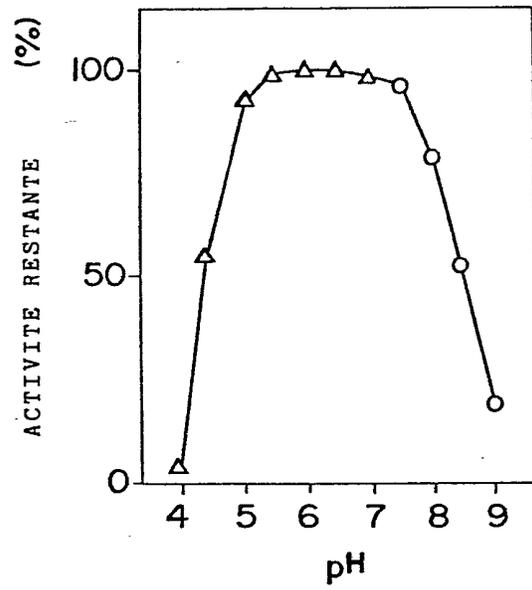


FIG. 3

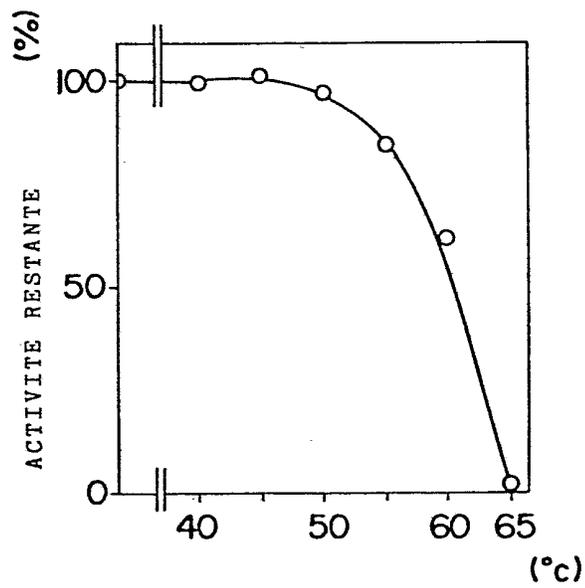


FIG. 4

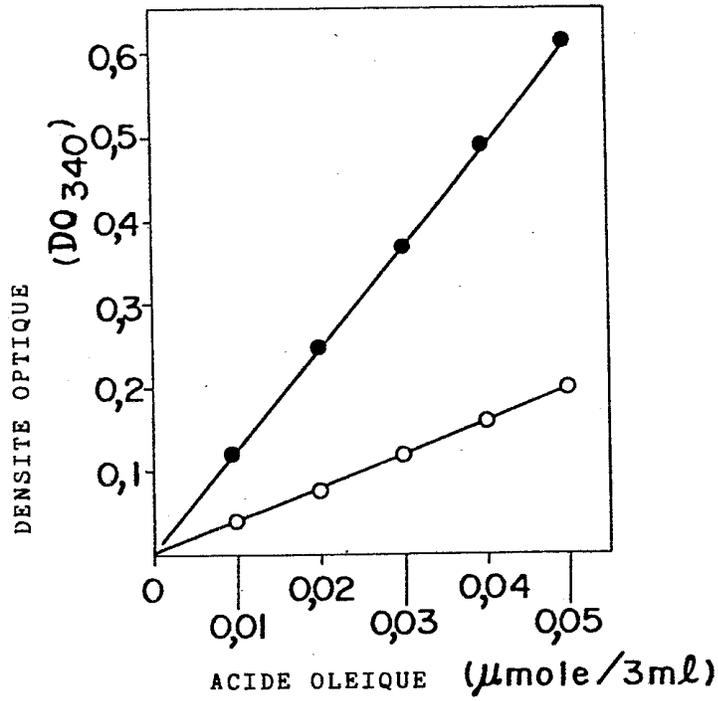


FIG. 5

