TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **iii**

AVANT-PROPOS ..... **iv**

RÉSUMÉ ..... **v**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU ..... **ix**

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES ..... **x**

LISTE DES SYMBOLES ..... **xii**

CHAPITRE I
INTRODUCTION **1**

1.1 Les enzymes 1

1.2 Structure et stabilité des protéines 2

1.3 Les enzymes lipolytiques 5

1.4 Les lipases 6

1.5 Principes d'enzymologie 10

1.6 Détection de l'activité lipase 12

1.7 Applications industrielles des lipases 14

1.8 Synthèse de biodiésel 15

1.9 Projet de recherche 16

CHAPITRE II
DEVELOPMENT OF A HIGH THROUGHPUT LIQUID STATE ASSAY FOR LIPASE ACTIVITY USING NATURAL SUBSTRATES AND RHODAMINE **18**

2.1 Contribution des auteurs 18

2.2 Résumé de l'article 18

2.3 Premier article scientifique 20

Abstract 21

Introduction 21

Materials and methods 23

Chemical and reagents 23

Liquid reaction mixture preparation 23

Activity assay and fatty acids standard curve 23

Colorimetric assay using p-nitrophenyl ester 24

Results and discussion 25

Determination of lipase activity using fluorescence from RhB olive oil emulsions 25

RhB-OOe lipase activity detection under various conditions 27

Determination of lipase activity using RhB-OOe method 28

Conclusion 28

Acknowledgments 28

References 29

CHAPITRE III
CHARACTERIZATION OF A NOVEL ALKALOPHILIC LIPASE FROM *ANEURINIBACILLUS THERMOAEROPHILUS*: LID HETEROGENEITY AND ASSIGNMENT TO FAMILY I.5 38

3.1 Contribution des auteurs 38

3.2 Résumé de l'article 38

3.3 Deuxième article scientifique 40

Abstract 41

Introduction 42

Materials and methods 44

Cloning of PCR products 44

Expression, purification and tag cleavage of recombinant LipAT 45

In silico analysis 46

Circular dichroism spectroscopy 46

Fluorescence spectroscopy 48

Dynamic light scattering analysis 48

Enzyme activity measurement 48

Lipase thermal stability measurements 49

Effect of metal ions 49

Biodiesel synthesis assay 50

Results and discussion 50

Production and purification of LipAT enzyme 50

Biophysical characterisation of LipAT 50
Enzymatic characterization 53
Potential industrial application: Biodiesel synthesis 55
In silico characterization 55
Conclusion 58
Acknowledgments 58
Declaration of interest 58
Funding information 58
Author contribution statement 58
References 59

CHAPITRE IV
DISCUSSION 72

4.1 Analyses *in silico* 72
4.2 Résolution de la structure et de la thermostabilité 74
4.3 Détection de l'activité hydrolytique 76
4.4 Caractérisation enzymatique 77
4.5 Applications industrielles 80
4.6 Conclusion 81

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 83

ANNEXE
NOTE DE RECHERCHE 87

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure **Page**

1.1 Les enzymes en tant que catalyseurs 2

1.2 Niveaux des structures des protéines 4

1.3 Paysage énergétique 5

1.4 Différents substrats des enzymes lipolytiques 6

1.5 Types de réactions catalysées par les lipases 7

1.6 Repliement typique des alpha/beta hydrolases 8

1.7 Mécanisme d'hydrolyse des lipases 9

1.8 Structure du couvercle et activation des lipases 10

1.9 Cinétique particulière aux lipases 12

1.10 Réaction de catalyse à partir des para-Nitrophényle esters 13

1.11 Détection de l'activité lipase 14

Tableau

1.1 Applications industrielles des lipases 15

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ala	Alanine
Asp	Acide aspartique
ARN	Acide ribonucléique
BLAST	Outil de base de recherche d'alignement local
CD	Dichroïsme circulaire
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA	Acide désoxyribonucléique
EstGtA2	Carboxylesterase provenant d'une souche de *Geobacillus thermodenitrificans*
FPLC	Rapide Chromatographie liquide des protéines
Glu	Acide glutamique
Gln	Glutamine
His	Histidine
IPTG	Isopropyl-β-D-l-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
LipAT	Lipase d'une souche d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus*
MEGA	Analyses moléculaires évolutif de la génétique
MSA	Alignement multiple des séquences
MWCO	Limite de poids moléculaire
Ni-NTA	Nickel-Acide nitriloacétique
OD	Densité optique
OO	Huile d'olive

TB	Terrific broth
TO	Trioléine
ORF	Cadre de lecture ouvert
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDB	Protein Data Bank
PMA	Acide phosphomolybdique
p-NP	Para-nitrophénol
RhB	Rhodamine B
RhB-OOe	Emulsion de Rhodamine B et huile d'olive
RhB-TOe	Emulsion de Rhodamine B et trioléine
RMS	Erreur quadratique moyenne
RMSD	Variance
RNA	Acide ribonucléique
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de Polyacrylamide en conditions dénaturantes (dodécylsulfate de sodium)
Ser	Serine
SEM	Erreur standard de la moyenne
TLC	Chromatographie en couche mince
Trp	Tryptophane
UV	Rayons ultraviolets
X	Acide aminé
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

LISTE DES SYMBOLES

Å	Ångström
Cal	Calorie
k_{cat}	Constante catalytique
K_M	Constante de Michaelis-Menten
°C	Degré centigrade
ΔS	Différentiel d'entropie
ΔH	Différentiel d'enthalpie
ΔG	Différentiel d'énergie libre
$[\Theta]$	Ellipticité
g	Gramme
J	Joule
K	Kelvin
kcal	Kilocalorie
kDa	Kilodalton
L	Litre
λ	Longueur d'onde
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
M	Molaire
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
nm	Nanomètre
Tm	Température de fusion
U	Unité d'activité enzymatique
V*max*	Vitesse maximal

Rapport-Gratuit.com

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les enzymes

Des milliers de réactions chimiques se déroulent constamment au sein de tous les organismes vivants leur permettant de se maintenir en vie, se reproduire, se développer et répondre aux stimuli de leur environnement. Les enzymes sont les agents responsables de la gestion de toutes les réactions chimiques au niveau cellulaire. Elles sont le centre de l'organisation du métabolisme et de la régulation des processus physiologiques. Plus précisément, les enzymes sont des macromolécules biologiques qui se distinguent par un énorme pouvoir catalytique. En fait, à l'exception de quelques enzymes composés d'ARN, les enzymes sont des protéines. Elles sont donc constituées de résidus d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques et possèdent une structure particulière qui leur concède une spécificité et un pouvoir catalytique exceptionnel. En ce qui concerne le pouvoir catalytique, il faut savoir que les enzymes permettent d'accélérer la vitesse de la réaction chimique en abaissant l'énergie d'activation de la réaction (Figure 1.1). De plus, de manière générale, les enzymes ne catalysent qu'un type précis de réaction et sont très spécifiques à leur substrat. De façon traditionnelle, le nom des enzymes est formé en ajoutant le suffixe –ase au nom du substrat qu'elles catalysent. Par contre, elles ont été répertoriées et classées systématiquement selon la Commission des Enzymes dans le but d'éliminer la confusion parfois associée à l'appellation commune. La nomenclature supérieure est divisée en six classes toutes dépendantes du type de réaction que les enzymes catalysent. Ces classes contiennent des sous-classes et elles-mêmes sont subdivisées en sous-sous-classes (Garrett *et al.*, 2000).

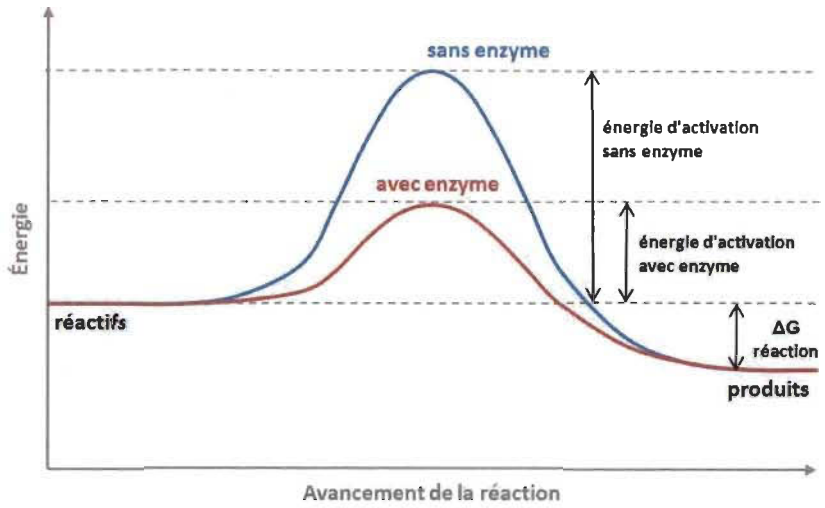


Figure 1.1 Les enzymes en tant que catalyseurs.
Les biocatalyseurs permettent d'augmenter la vitesse de réaction par diminution de l'énergie d'activation sans apparaitre dans l'équation de la réaction.

1.2 Structure et stabilité des protéines

Afin de bien comprendre les fonctions rattachées aux protéines, il est primordial de comprendre les niveaux de structures et les forces dominantes qui régissent le repliement. En fait, l'architecture tridimensionnelle des protéines est complexe et étroitement liée à la fonction. Tout d'abord, le comportement et la structure sont déterminés par la composition chimique d'une enzyme qu'on appelle la structure primaire. La structure primaire est en fait la séquence des différents résidus d'acides aminés qui forme le polymère protéique. Les différentes chaines latérales de ces résidus ainsi que le squelette fait de liaisons peptidiques sont à l'origine des différentes forces et contraintes qui sont à la base de la structure des protéines (Campbell, 1999). Des interactions faibles entre des dipôles, des ponts hydrogène, des interactions électrostatiques et la force hydrophobe expliquent le repliement spécifique adopté par les protéines. Dans une protéine, la formation de ponts hydrogènes ou de ponts salins permet d'abaisser l'enthalpie par la neutralisation de dipôles ou de charges, permettant la formation de structures périodiques. Ces interactions peuvent imposer deux types de conformations spéciales, l'une de type hélicoïdal et l'autre en feuillet plissé. Elles sont

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

appelées structures secondaires et impliquent une répétition de la localisation dans l'espace du squelette du polymère peptidique. L'effet entropique qui est dominé par l'effet hydrophobe défavorise l'interaction entre l'eau et le polypeptide déplié. C'est en fait l'aversion de l'eau envers l'état dénaturé (qui expose des résidus non polaires) qui stabilise l'état plié, natif des protéines et des enzymes (Berg *et al.*, 1991). La force hydrophobe a un effet déterminant au niveau de la structure des protéines. Ces forces tiennent leur nom d'une minimalisation du contact des substances non polaires, chaînes latérales hydrophobes, et l'eau (Nicholls *et al.*, 1991). Pour mieux comprendre, il faut savoir que les molécules d'eau qui bordent la cavité constituée de groupements non polaires doivent s'orienter pour recréer un réseau de liens hydrogènes qui inclut la cavité. Cette orientation forcée des molécules d'eau décroit le désordre, car le nombre de ponts hydrogènes que l'eau peut former à la surface d'une région non polaire (hydrophobe) ainsi que le niveau de liberté de ces molécules d'eau est moindre que ceux qui sont accessibles dans l'eau pure. En ce qui concerne la structure, il est aussi possible de distinguer deux autres niveaux structuraux, soit tertiaires et quaternaires. Le niveau tertiaire implique la formation d'une intercalation des éléments de structures secondaires qui permet de cacher un maximum de résidus non polaires, en atteignant un niveau de compacité quasi-cristallin. Les protéines et enzymes peuvent aussi être constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques en interaction. Chacune de ces chaînes est considérée comme une sous-unité et l'assemblage constitue la structure quaternaire (Figure 1.2). L'hémoglobine est un exemple de protéine constituée de plusieurs sous-unités.

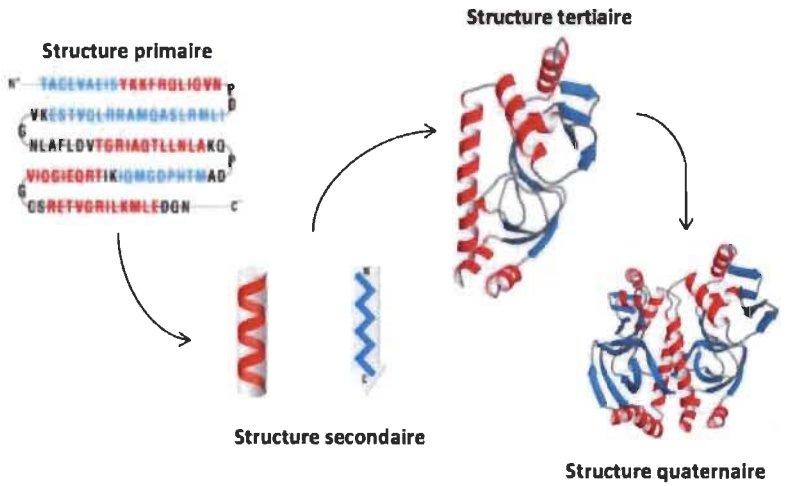


Figure 1.2 Niveaux des structures des protéines.
La séquence d'acides aminés constitue la structure primaire. L'hélice alpha et le feuillet bêta sont deux types de structures secondaires périodiques. Le repliement tridimensionnel forme la structure tertiaire et le rassemblement de plusieurs sous-unités forme la structure quaternaire. Adaptée de : Gregory A Petsko et Dagmar Ringe (2004). Protein structure and function. Londres, New science press, p. 3.

Certaines questions d'ordre assez fondamentales s'imposent lorsqu'on aborde la question de la structure des protéines. Est-ce que la structure native d'une protéine et ses propriétés est déterminée uniquement par sa séquence? Est-ce que le repliement est un processus opérant au fur et à mesure que la protéine est synthétisée? Est-ce que le mécanisme de repliement est fondé sur la réorganisation jusqu'à l'atteinte d'un minimum énergétique? En fait, le dogme d'Anfinsen suggère que seule la séquence détermine le repliement d'une protéine (Klumpp et Baumeister, 1998). Cependant, la possibilité d'obtenir un repliement très similaire par deux séquences d'acides aminés différentes n'est pas surprenante. D'ailleurs, plusieurs protéines présentant un très faible degré d'identité adoptent un repliement semblable. Cela suggère que le repliement n'est pas strictement déterminé par l'identité des résidus d'acides aminés reliés les uns aux autres. Certains résidus et certains motifs doivent nécessairement favoriser des interactions particulières à un repliement de manière à servir d'encrage au processus de repliement. Ainsi, le paradoxe de Levinthal suggère que si la séquence d'acides aminés explore l'ensemble des possibilités conformationnelles permises par sa chaîne

polypeptidique, elle devrait essayer au moins 10^{143} conformations possibles avant d'atteindre sa structure finale (Zwanzig *et al.*, 1992). Cela nécessiterait un temps supérieur à l'âge de l'univers, cependant le repliement des protéines est un processus quasi instantané. Il est donc impensable que toutes les possibilités soient explorées, ce qui suggère que le repliement doit s'effectuer par un cheminement préférentiel, un chemin ou « paysage énergétique » (Figure 1.3.) (Hartl et Hayer., 2009).

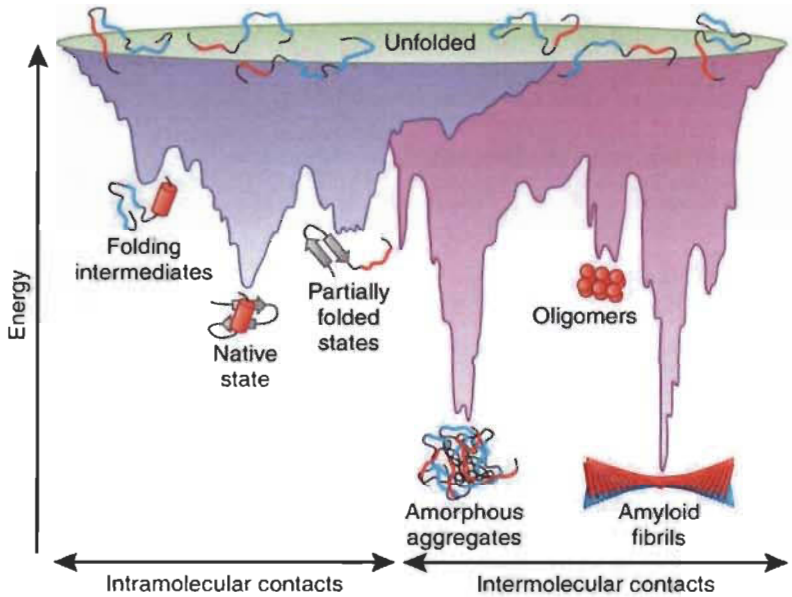


Figure 1.3 **Paysage énergétique.**
Illustration de la multitude des conformations conduisant à l'état natif des protéines par un chemin préférentiel. Adaptée de : F Ulrich Harti et Manajit Hayer-Harti (2009). Convering concepts of protein folding in vitro and in vivo. Nature Structural & Molecular Biology 16; 574-581.

1.3 Les enzymes lipolytiques

De manière générale, les enzymes lipolytiques font partie de la grande famille des hydrolases. Elles catalysent des réactions en lien avec différents substrats, tels que les phospholipides, les lipides et le cholestérol (Figure 1.4) et sont connues par leur chimiosélectivité et énantiosélectivité. Dans la nature, elles sont ubiquitaires et se retrouvent dans les trois règnes du vivant jouant différents rôles physiologiques. Elles sont notamment impliquées dans la digestion chez les mammifères (lipases

pancréatiques permettant l'absorption des lipides). D'ailleurs, elles sont de plus en plus reliées à certaines maladies par leur implication dans l'absorption du cholestérol et le transfert des lipides entre les tissus (Kuranobu *et al.*, 2015). L'hyperlipémie congénitale est une maladie connue pour son lien avec les lipoprotéines. Elle pourrait survenir à cause d'une carence en lipoprotéine lipase (Brunzell, 2014). L'implication au niveau des maladies est souvent la première idée qui vient en tête. Cependant, elles sont également connues par leur implication dans l'utilisation de sources de carbone et détoxification chez les microorganismes. Les bactéries synthétisent différents types d'enzymes lipolytiques telles que les carboxylestérases et les lipases. De manière générale, elles catalysent l'hydrolyse des triglycérides afin d'utiliser le glycérol relâché en tant que source d'énergie suite à la conversion au niveau de la glycolyse.

Phospholipides **Triglycérides** **Cholestérol**

Figure 1.4 Différents substrats des enzymes lipolytiques.
Les phospholipides, triglycérides et le cholestérol peuvent être des substrats pour les enzymes lipolytiques.

1.4 Les lipases

Les lipases (EC 3.1.1.1) sont uniques dans leur genre par leur caractère versatile. Elles catalysent une panoplie de réaction avec des triglycérides; plus particulièrement, elles sont impliquées dans l'hydrolyse, la transestérification, l'interestérification, l'alcoolyse et l'acidolyse (Figure 1.5) (Gandhi, 1997). Les réactions d'hydrolyse et de transestérification catalysées par des lipases ont été largement étudiées pour leur potentiel d'application industrielle (Gandhi, 1997).

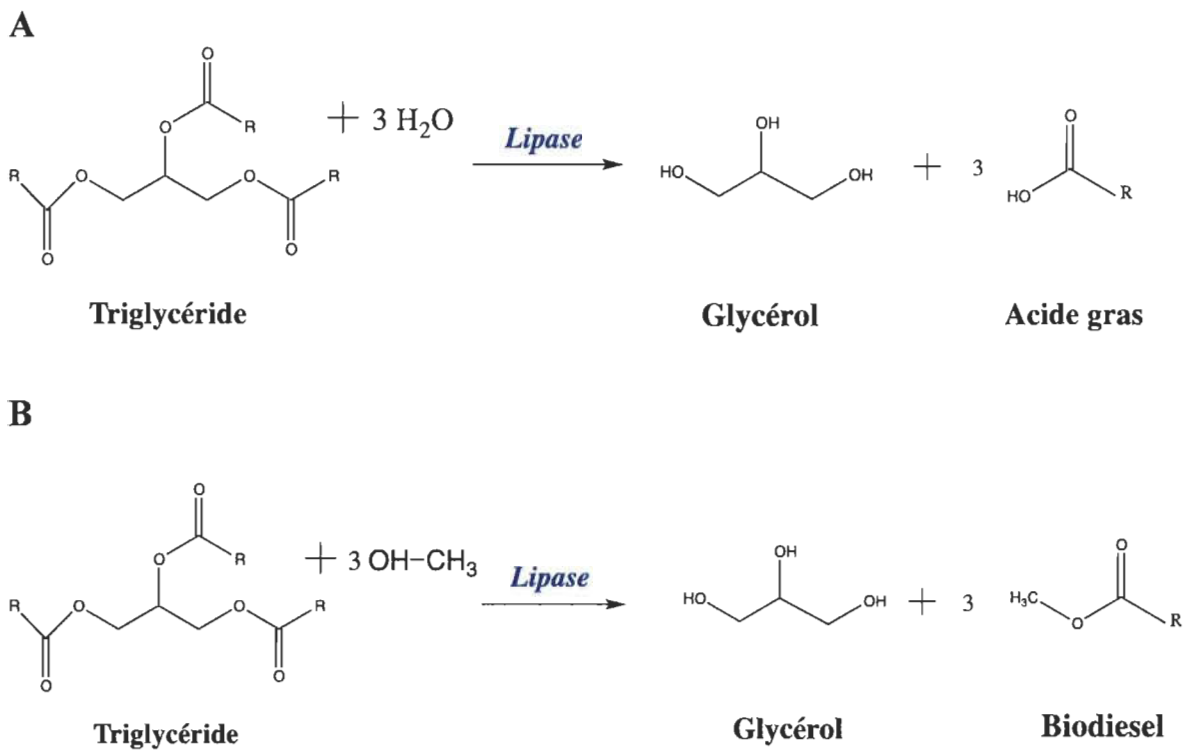


Figure 1.5 Types de réactions catalysées par les lipases.
(A) Réaction d'hydrolyse et **(B)** réaction de tranestérification.

De plus, elles catalysent des réactions sur une large gamme de substrats. Les différences se trouvent au niveau de la longueur et de la saturation des chaînes d'aliphatiques des triglycérides.

Au niveau de la structure, les lipases adoptent le repliement α/β hydrolase qui consiste en un noyau formé de feuillets bêta typiquement parallèles, mais qui pourraient aussi être mixtes. Ce dernier est bardé d'hélices alpha. Typiquement, les lipases possèdent une triade catalytique qui consiste en une Ser positionnée dans le coude nucléophile et d'un résidu acide (l'Asp ou le Glu) et une His (Figure 1.6) (Ollis *et al.*, 1992; Nardini, 1999). Le niveau d'homologie est assez faible en ce qui concerne les lipases. Cependant, ce type de structure (α/β hydrolase) et la triade catalytique sont notamment adoptés par la majorité des enzymes lipolytiques. Il est donc intéressant de remarquer que cet échafaudage solide est possiblement à la base de l'évolution de différents types de fonctions chez les enzymes lipolytiques. Le coude nucléophile est

aussi bien conservé. Ce motif est typiquement formé d'un pentapeptide conservé GXSXG au niveau duquel la sérine est présentée (Arpigny et Jaeger, 1999; Nardini *et al.*, 1999).

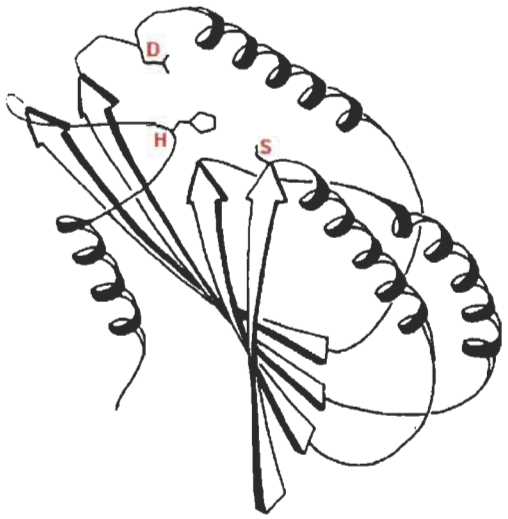


Figure 1.6 Repliement typique des alpha/beta hydrolases.
Ce repliement est bien conservé au niveau de l'évolution chez les enzymes lipolytiques ainsi que la triade catalytique. Adaptée de : Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F *et al.* (1992). The α/β hydrolase fold. Protein Eng 5: 197-211.

Ce repliement permet la formation d'une pochette de liaison où la triade catalytique est présente. Le mécanisme d'hydrolyse se résume à une attaque d'une sérine nucléophile. En fait, l'Asp chargé négativement forme un pont salin avec l'His délocalisant les électrons au niveau de son cycle imidazole. Cela permet au noyau imidazole de déprotoner le groupe hydroxyle de la sérine et d'augmenter sa nucléophilicité. L'attaque nucléophile de la sérine se fait au niveau du carbocation de la liaison ester du substrat (Figure 1.7). Cela conduit à la formation d'un intermédiaire tétraédrique qui est stabilisé par les résidus du trou de l'oxyanion qui forment des ponts hydrogène avec le substrat. L'intermédiaire est décomposé par la libération du groupe alcool menant à la formation d'une acyl-enzyme. Celle-ci est hydrolysée par une molécule d'eau. Ensuite, il y a formation d'un deuxième intermédiaire tétraédrique, lequel se décompose pour libérer le groupe acide et reformer la triade catalytique qui pourra catalyser à nouveau l'hydrolyse d'une réaction.

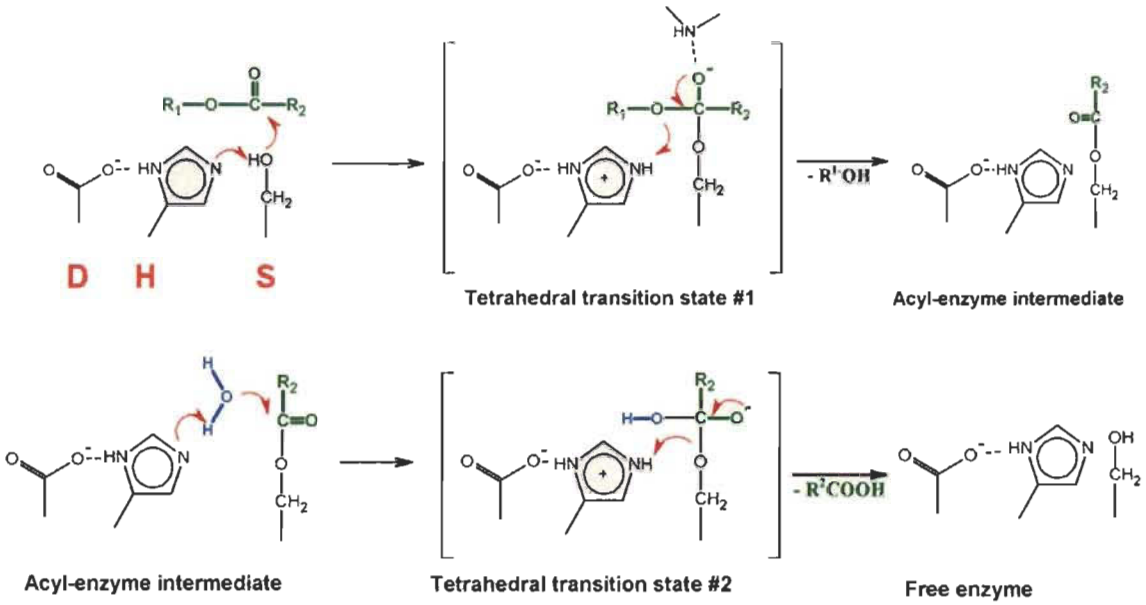


Figure 1.7 Mécanisme d'hydrolyse des lipases.
La triade catalytique favorise l'attaque nucléophile par la Ser activée. Adaptée de : David Charbonneau. Rôle des interactions électrostatiques dans la stabilité de nouvelles enzymes lipolytiques bactériennes à potentiel d'application industrielle. Thèse de doctorat : Biophysique et biologie cellulaire. Université du Québec à Trois-Rivières, 2014, page 9.

Un autre point d'intérêt au niveau des lipases est le fait qu'elles catalysent l'hydrolyse de substrats partiellement hydrosolubles ou même hydrophobes en étant elles-mêmes amphiphiles. Cela est possible par une particularité de la structure des lipases. En fait, autre que le corps α/β et la triade catalytique, elles présentent un domaine mobile qui couvre le site actif et module la fonction de l'enzyme. Ce domaine, communément appelé couvercle, est constitué d'une ou plusieurs hélices particulièrement mobiles permettant le dégagement du site actif lors d'un contact hydrophobe. Les lipases sont donc inactives en milieu aqueux et activées à l'interphase lipide-eau (Figure 1.8). Ce phénomène est connu sous le nom d'activation interfaciale hydrophobe. Cette structure semble jouer un rôle important non seulement au niveau de la modulation de l'activité, mais aussi au niveau de la spécificité, l'énantiosélectivité et la stabilité (Secundo *et al.*, 2006). D'ailleurs, la conservation d'un motif du domaine du couvercle est observée dans certains types de lipases thermostables (Chakravorty *et al.*, 2011).

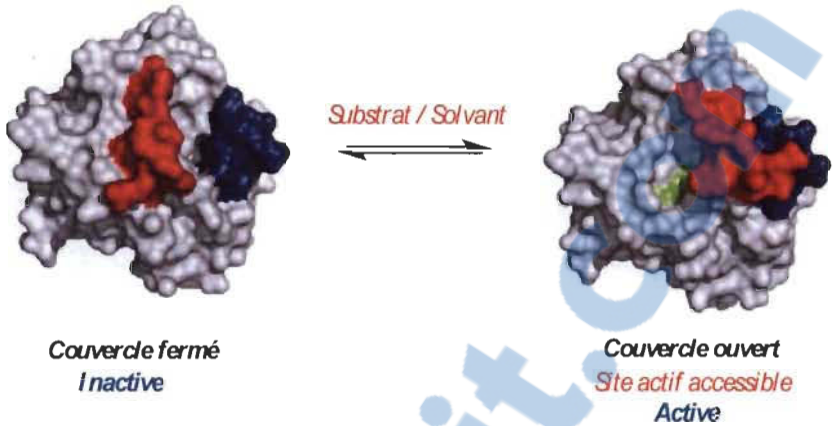


Figure 1.8 Structure du couvercle et activation des lipases.
Les structures hélicoïdales étant le couvercle sont identifiées en rouge et bleu. Celui-ci couvre le site actif lors de l'état inactif de l'enzyme. Suite à un contact interfacial hydrophobe, le couvercle dégage le site actif (en vert) de manière à activer l'enzyme permettant la catalyse du substrat.

1.5 Principes d'enzymologie

L'étude de l'architecture complexe des protéines prend encore plus d'intérêt lorsqu'on se demande comment la structure peut être responsable de la spécificité et de l'efficacité de la réaction qu'elle catalyse. Pour ce faire, il est primordial de caractériser son activité enzymatique. Le schéma le plus simple qu'on puisse présenter d'une réaction enzymatique se résume au mécanisme biomoléculaire conduisant à la régénération du catalyseur. Cette généralisation a été proposée par les célèbres Leonor Michaelis et Maud L. Menten en 1913.

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \xrightarrow{k_{cat}} E + P \qquad (1.1)$$

Ils ont imaginé que le complexe réversible enzyme-substrat est formé très rapidement, cependant, celui-ci est décomposé lentement pour régénérer l'enzyme et libérer le produit. La vitesse initiale reflète l'étape limitante, soit la dissociation du complexe enzyme-produit. En fait, Michaelis et Menten supposaient que la vitesse de transformation d'un substrat est lente à cause que l'enzyme a notamment *« du mal à se*

Rapport-Gratuit.com

débarrasser » du produit. Ils définissent donc une constante de dissociation du complexe enzyme-substrat qui est connu sous le nom de la constante de Michaelis (K_m). Cette constante sert à déterminer le degré d'affinité d'une enzyme pour son substrat. Suite au développement, Michaelis et Menten ont défini ces concepts par l'expression suivante (1, 2) :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \tag{1.2}$$

Dans le cas des lipases, l'application des concepts développés par Michaelis et Menten est légèrement plus complexe considérant le phénomène d'activation interfaciale. Le schéma représentant une réaction enzymatique telle que décrite par Michaelis et Menten doit être modifié de manière suivante afin de considérer l'étape d'activation des lipases :

$$E \rightleftharpoons E^* + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [E^*S] \xrightarrow{k_{cat}} E + P \tag{1.3}$$

Ce phénomène particulier aux lipases se révèle au niveau de la cinétique enzymatique par une tendance sigmoïdale de la relation vitesse initiale vs concentration du substrat (Figure 1.9). Les lipases se différencient clairement par leur cinétique enzymatique des autres enzymes lipolytiques tels que les estérases qui suivent la cinétique de type Michaelis et Menten. Elles imposent la considération de l'activation interfaciale (Verger, 1997) au niveau des calculs des vitesses initiales, maximales et K_m.

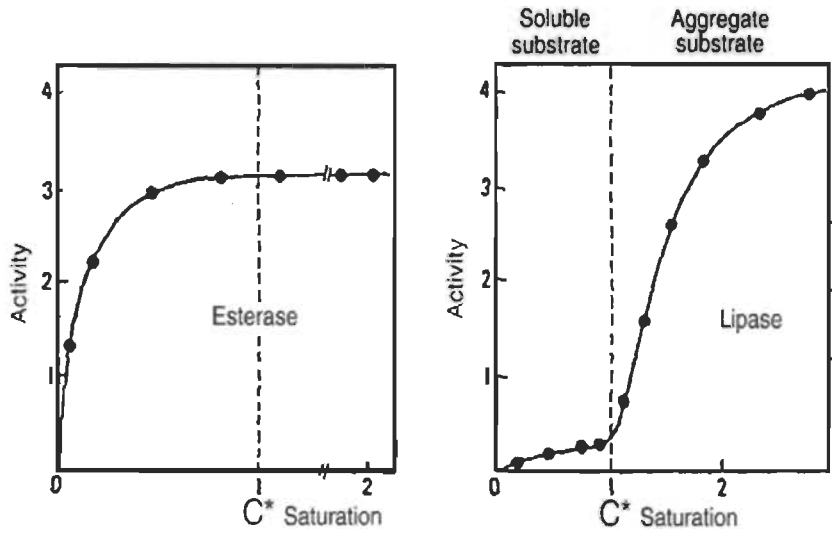


Figure 1.9 Cinétique particulière aux lipases.
Différence entre la cinétique type Michaelis et Menten à gauche représenté par des estérases et les lipases à droite. Un délai d'activation est observé dans la cinétique des lipases par la tendance sigmoïdale due à l'activation interfaciale nécessaire pour le déplacement du couvercle permettant l'accès du substrat au site actif. Adaptée de : Verger R. (1997) 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. Trends in Biotechnology 15 : 32-38.

1.6 Détection de l'activité lipase

Le développement de nouvelles applications pour les lipases est très dépendant de l'identification des propriétés désirées. Cela nécessite une caractérisation précise et multifactorielle de ces catalyseurs (Zottig *et al.*, 2015). Différentes méthodes ont été développées dans ce but, chacune avec des avantages et désavantages. Une des méthodes les plus couramment utilisées repose sur la détection colorimétrique employant des dérivés para-nitrophényles esters (Figure 1.10). L'avantage de cette méthode est la simplicité et la rapidité. Par contre, les para-Nitrophényles esters ne sont ni des substrats naturels des lipases ni des substrats ciblés en industrie. De plus, cette technique nécessite l'utilisation de solvants organiques afin de solubiliser ce type substrat. Certains solvants organiques agissent comme inhibiteurs de l'activité enzymatique en favorisant la dénaturation de l'enzyme. Les conditions réactionnelles de

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

cette méthode ne ressemblent en rien aux conditions réactionnelles typiques des lipases (Gupta *et al.*, 2003).

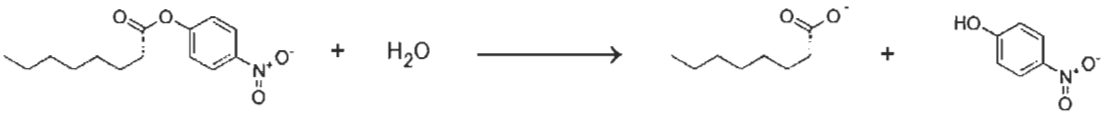


Figure 1.10 Réaction de catalyse à partir des para-Nitrophényle esters. Cette réaction est catalysée par des lipases et permet la détection du Nitrophénol relâché qui possède une coloration jaune.

Une autre méthode communément utilisée pour quantifier l'activité enzymatique des lipases est la titrimétrie. Cette méthode permet d'utiliser des substrats naturels, tels que la trioléine. Cependant, cette méthode est longue et fastidieuse et ne peut être adaptée au criblage à haut débit (Leemhuis *et al.*, 2009). Il est très populaire également de détecter l'activité enzymatique de manière qualitative à l'aide de géloses contenant de l'huile d'olive en tant que substrat naturel des lipases et la rhodamine B en tant qu'indicateur (Gupta *et al.*, 2003; Carissimi *et al.*, 2007). L'activité est détectée par l'apparition d'un halo rose fluorescent lorsque le Petri est exposé à la lumière UV (Figure 1.11). Cette même technique a été reprise par *Jette et Ziomek* dans des plaques de 96 puits et la fluorescence reliée à la catalyse est mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Kouker et Jaeger, 1987). Cependant, la préparation des plaques est très complexe puisqu'elle doit être réalisée à haute température afin d'éviter la gélification prématurée de l'agarose. De plus, il est très difficile de tenir compte du facteur de diffusion de l'enzyme dans le gel où la réaction a lieu. Les conditions réactionnelles telles que le pH et la température ne sont pas facilement contrôlables ou compatibles à l'état solide, car elles ont un impact sur la polymérisation. D'autres tests ayant recours à des anticorps ou des substrats chromogéniques sont également utilisés, mais ce type de tests sont généralement coûteux. Ils ne sont pas utilisés pour le criblage à haut débit de l'activité lipase (Gupta *et al.*, 2003; Jette et Ziomek, 1993).

Figure 1.11 Détection de l'activité lipase.
Gélose permettant la détection de l'activité à l'aide de l'huile d'olive en tant que substrat et de la rhodamine B qui agit comme indicateur. Un halo rose signe d'activité lipase est observé lorsque le pétri est exposé à la lumière UV.

1.7 Applications industrielles des lipases

L'énorme potentiel des enzymes est de plus en plus exploité par les industries. D'ailleurs, le marché mondial des enzymes est évalué à sept milliards de dollars pour l'année 2017 (BCC research, 2012). Les lipases constituent le groupe de biocatalyseurs le plus important au niveau du marché mondial en grande partie à cause de leur caractère versatile. Elles sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour la production d'esters aromatiques, des esters de sucres qui sont utilisés comme émulsifiants et pour modifier la composition des acides gras dans les triglycérides. Par leur chemiosélectivité, les enzymes lipolytiques permettent d'introduire des poly-insaturations menant à des oméga-3 ou d'éliminer les acides gras saturés permettant ainsi de réduire le risque de maladies cardiovasculaires. Les lipases sont également utilisées dans l'industrie pharmaceutique dans le but de préparer des composés optiquement purs pour la synthèse de certaines drogues. Leur énantiosélectivité permet de produire des énantiomères biologiquement actifs à moindre coût. Elles sont utilisées dans l'industrie des cosmétiques et des parfums pour produire des mono- et diacylglycérols qui sont employés en tant que surfactants et composés aromatiques (arômes). Dans l'industrie des pâtes et papier, elles sont utilisées entre autres pour le traitement des extractibles lipidique du bois qui réduisent la qualité et la résistance du papier (Zottig *et al.*, 2015). De plus, elles peuvent être utilisées en biochimie clinique en tant que biomarqueurs afin de détecter une pancréatite ou une infection tuberculose. Les lipases peuvent aussi être

utilisées en tant qu'alternative de la synthèse alcaline pour la production de biodiésel (Korman *et al.*, 2013). Dans ce cas, elles constituent une solution écologique à l'utilisation de produits nocifs pour l'environnement. Finalement, leur plus grande utilisation est dans l'industrie de détergents en tant qu'additif dans le but de faciliter l'élimination de tâches dans certains savons à lessive et d'augmenter le pouvoir nettoyant des détergents à vaisselle (Figure 1.12) (Lopez-Lopez *et al.*, 2015; Kirk *et al.*, 2002). Les lipases peuvent être utilisés autant libres en solution qu'immobilisés dans des résines permettent une récupération de l'enzyme.

Tableau 1.1

Applications industrielles des lipases (Kirk *et al.*, 2002)

Industrie	Application
Détergents (vêtements et vaisselle)	Élimination des taches lipidiques
Agroalimentaire	Saveur fromages Stabilité et de conditionnement de pâte (boulangerie) Émulsifiant
Pâtes et papier	Control des extractibles lipidiques du bois (Pitch)
Synthèse organique	Résolution d'alcools et amides chiraux
Cuir	Macération/décapage

1.8 Synthèse de biodiésel

Les problématiques actuelles reliées à la diminution des combustibles fossiles et la pollution ont contribué au développement de sources d'énergie alternatives. Le biodiésel est considéré comme un bon substituant pour le diésel considérant ses caractéristiques, telles que la biodégradabilité, sa toxicité réduite et son faible niveau d'émission des gaz à effet de serre (Casarini *et al.*, 2015). De manière générale, la synthèse de biodiésel se fait par la méthode de synthèse chimique en milieu alcalin, ce qui sous-entend une transestérification d'un triglycéride à partir d'un alcool permettant la formation d'un

ester méthylique. Le chauffage est nécessaire pour accélérer la réaction, ainsi que l'utilisation d'un catalyseur qui est une base forte. De plus, lors de l'hydrolyse lipidique, le glycérol est un produit secondaire et celui-ci est couramment utilisé dans l'industrie alimentaire. Les lipases sont de plus en plus considérées comme une alternative prometteuse pour la production de biodiésel due au rapport coût-efficacité et à leur caractère écologique. En fait, ces enzymes peuvent être immobilisés et réutilisés de nombreuses fois. Le processus ne requiert pas de chauffage et cela est avantageux du côté consommation d'énergie pour la réaction. En outre, les lipases sont très spécifiques et permettent l'utilisation d'huiles à faible pureté et même usagées, cela représentant encore un avantage côté écologique. Au niveau plus fondamental, il est intéressant de considérer que la synthèse de biodiésel à l'aide de lipases passe par un mécanisme qui implique l'hydrolyse des triglycérides parallèlement à la transestérification. Cependant, la formation d'acides gras, de di- et mono- glycérides ne nuit pas à la réaction de synthèse de biodiésel puisque il est possible de former des esters méthyles à partir des produits de réaction mentionnés précédemment (Li *et al.*, 2015).

1.9 Projet de recherche

Une grande quantité d'enzymes utilisées en industries n'est toujours pas optimalement adaptée aux conditions industrielles, et pire certaines applications pourtant prometteuses soufrent de l'absence d'enzymes pouvant y être mise à contribution. Dans le but d'apporter des améliorations aux enzymes pour leur application en industrie, il est primordial de mieux comprendre ce qui régit leurs propriétés enzymatiques. Dans mes travaux de maîtrise, on s'est intéressé au développement des connaissances fondamentales des relations structure-activité des lipases. Dans le cadre de mon projet, nous avons identifié une nouvelle lipase thermotolérante (LipAT) à partir d'une souche bactérienne thermophile *Aneurinibacillus thermoaerophilus* isolée de compost de fumier. Un gène codant pour cette lipase a été cloné, séquencé et surexprimé chez *Escherichia coli*. Cette enzyme a été purifiée et caractérisée *in silico*, au niveau structural et enzymatique. Nous avons comparé la séquence de cette nouvelle lipase avec des homologues et identifié certains motifs conservés (de façon variable) chez cette

enzyme. Également, nous avons construit un modèle par homologie où ces motifs ont été identifiés. Entre autres, nous avons identifié un motif pour le couvercle de cette enzyme qui se différencie grandement des autres motifs préalablement identifiés pour ses homologues. Ainsi, un arbre phylogénétique a été construit afin de comparer notre lipase avec d'autres de la même famille. Nous avons réalisé une caractérisation biophysique où nous avons utilisé les techniques de dichroïsme circulaire et diffusion dynamique de la lumière dans le but de caractériser les structures secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme. Pour compléter les études biophysiques, la stabilité thermique a été étudiée en fonction du pH. De plus, afin de réaliser une caractérisation enzymatique dans des conditions semblables à celles utilisées en industrie, nous avons développé une nouvelle méthode de détection d'activité lipase rapide en utilisant la fluorescence de la rhodamine B comme indicateur et des substrats naturels. Cette nouvelle méthode a fait l'objet d'une publication scientifique acceptée et fait l'objet du chapitre II de ce mémoire. Le pH et la température optimale pour l'activité hydrolytique de LipAT ont été déterminés par cette méthode de détection en utilisant l'huile d'olive comme substrat. La caractérisation exhaustive de cette nouvelle lipase fait l'objet d'un deuxième article en préparation.

CHAPITRE II

DEVELOPMENT OF A HIGH THROUGHPUT LIQUID STATE ASSAY FOR LIPASE ACTIVITY USING NATURAL SUBSTRATES AND RHODAMINE

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit qui a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue « Analytical Biochemistry ». L'article a été accepté en novembre 2015 et publié en 2016. La référence de cet article est la suivante :

Zottig X, Meddeb-Mouelhi F et Beauregard M. (2016) Development of a high throughput liquid state assay for lipase activity using natural substrates and rhodamine B. Analytical biochemistry, 496, 25-29.

2.1 Contribution des auteurs

L'ensemble des expériences à la base de cet article a été conçu en étroite collaboration entre Ximena Zottig et Fatma Meddeb. Ximena Zottig a réalisé (ou supervisé) la partie expérimentale et a écrit le premier manuscrit. Marc Beauregard et Fatma Meddeb ont aussi participé à l'écriture et à l'édition du manuscrit. Guillaume Lemieux et Nikolas Beauchesne ont aidé à différents aspects du travail expérimental.

2.2 Résumé de l'article

Une méthode de détection basée sur la fluorescence pour la détermination de l'activité lipase en utilisant rhodamine B comme indicateur et des substrats naturels de l'enzyme est décrite. Cette méthode à haut débit est simple, rapide et peut être automatisée, ce qui convient pour le dépistage de mutants ou variantes d'intérêt, et à l'application de la métagénomique. Ce nouveau test est basé sur l'utilisation d'une

émulsion rhodamine B-substrat naturel. L'état liquide de ce test est ce qui le rend avantageux par rapport aux essais en gélose communément utilisés. Les conditions de réaction telles que la température et le pH peuvent être réglées et contrôlées. L'utilisation de la trioléine ou l'huile d'olive en tant que substrats naturels permet la détection de l'activité lipase dans des conditions de réaction qui sont très proches de celles utilisées dans les milieux industriels. La méthode décrite est sensible sur une large gamme de concentrations du produit et offre une bonne reproductibilité.

2.3 Premier article scientifique

Development of a high throughput liquid state assay for lipase activity using natural substrates and rhodamine B

Ximena Zottig[1,2#], Fatma Meddeb-Mouelhi[1,2#] and Marc Beauregard[1,2*]

[1] Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques, Université du Québec Trois-Rivières, 3351 Boul. Des Forges, C.P. 500 Trois-Rivières (Québec) G9A 5H7, Canada

[2] PROTEO, Université Laval, 2705 Boul. Laurier, Québec (Québec) G1V 4G2, Canada

[#] These authors have contributed equally to this work.

[*] To whom correspondence should be addressed:
Marc Beauregard, Ph.D.
Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques
Université du Québec à Trois-Rivières,
C.P. 500, Trois-Rivières (Québec), G9A 5H7.
Tel: (819) 376-5011 # 3354
Fax: (819) 376-5084
E-mail: marc.beauregard@uqtr.ca

Keywords: Lipase activity, Rhodamine B, Olive oil, Fluorescence

Abbreviation used: RhB, rhodamine B; OO, olive oil; RhB-OOe, rhodamine B-olive oil emulsion mixture; RhB-TOe, rhodamine B-triolein emulsion mixture; pNP, para-nitrophenyl; LipAT, Lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus*; EstGtA2, Carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*.

Rapport-Gratuit.com

Abstract

A fluorescence-based assay for the determination of lipase activity using rhodamine B as an indicator and the enzyme's natural substrates is described. This high throughput method is simple, rapid and can be automated, making it suitable for screening and metagenomics application. It is based on the use of a rhodamine B-natural substrate emulsion in liquid state, which is advantageous over agar plate assays. Reaction conditions such as pH and temperature can be varied and controlled. Using triolein or olive oil as natural substrates allows monitoring of lipase activity in reaction conditions that are closer to those used in industrial settings. The described method is sensitive over a wide range of product concentrations and offers good reproducibility.

Introduction

Enzymatic reactions often surpass chemical transformations in term of cost, product yield, reaction conditions, specificity and efficiency. Furthermore, enzymes are biodegradable while many chemical catalysts are not. Their advantages are recognised in several industrial sectors, and as a consequence, the enzyme market is predicted to reach 6 billion USD by 2018 (1). Lipases (E.C. 3.1.1.3) are one of the most important industrial biocatalysts (1, 2). They catalyze a variety of reactions using a vast array of substrates. However versatile, lipases are primarily tailored for the hydrolysis of acyl glycerides (3); their ability to hydrolyse ester bonds and release glycerol and fatty acids confers these enzymes a huge potential for industrial applications (4, 5). The development of novel applications for lipases, however, is highly dependent on the identification of enzymes with desired properties, which requires precise characterization of these catalysts (6).

Lipase hydrolysis is commonly measured via colorimetric assay using *para*-nitrophenyl esters (*p*NP-esters) as substrates. The advantages of this method over others such as titrimetric analysis include its rapidity and simplicity (7). Unfortunately, *p*NP-esters are not natural substrates of lipases, nor are they the intended industrial target, and often

require the use of organic solvents (8, 9). For a qualitative approach with natural substrates, a rhodamine B plate assay with olive oil has been widely used for the identification of microbial lipases (10, 11). Activity leads to hydrolytic halos, which contain released fatty acids, and are revealed under UV light.

The use of rhodamine B (RhB) for the quantitation of lipase activity has been described previously by *Jette and Ziomek* (9). Lipase hydrolytic activity was calculated on the basis of fluorescence emission observed when RhB interacts with released fatty acid. This assay, however, involves solid reaction media (agar), which makes this method complicated and less flexible than a liquid based approach. Using solid media also decreases reproducibility because of the slow enzyme diffusion rate through a rhodamine-triglyceride-agarose plate gel (9). Furthermore, preparing multi-well gel agarose plates as a means to increase throughput requires numerous complex steps. Additionally, some steps cannot be performed by an automated pipetting station impairing its use for high throughput screening experiments.

In this study, we propose an improved fluorescence-based assay for quantitative lipase activity detection using natural triglycerides as substrates in liquid state, using 96 well plates. (alternate sentence if you means entire assay is in liquid state: "In this study, we propose an improved fluorescence-based assay for quantitative lipase activity detection using natural triglycerides as substrates, and which can be carried out in liquid format using 96 well plates". Towards this goal, we have prepared a stable emulsion using tiolein or olive oil, RhB and gum arabic that is easily pipetted and fully compatible with a high throughput format. Fatty acids that are released via lipase action interact with RhB leading to fluorescence intensity changes measured with a plate reader.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Materials and methods

Chemical and reagents

Rhodamine B, gum arabic from the acacia tree, sodium phosphate, triolein (TO), *p*- nitrophenyl stearate (*p*-NPC18), *p*-nitrophenol (*p*-NP) and oleic acid were purchased from Sigma Aldrich. Olive oil (OO) was from Bertolli (Gentile extra virgin) purchased in a local grocery. Commercial Lipase A was obtained from Buckman North America. Lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (LipAT) and carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans (*EstGtA2) were produced and purified in our laboratory using a recombinant DNA strategy (12, 13).

Liquid reaction mixture preparation

A rhodamine B-olive oil (or triolein) emulsion mixture (RhB-OOe or RhB-TOe) was prepared using 20 mM sodium phosphate pH 7.5% (w/v) gum arabic, 0.001% (w/v) RhB and 2.5% (v/v) OO or TO. The mixtures were emulsified with a DrinkMaster for 5 minutes and then the pH was adjusted. Fluorescence spectra of emulsified solutions with and without lipase were recorded to verify the maximum emission wavelength for monitoring fatty acid release. The emulsions were stored at 4°C away from light to avoid fluorophore bleaching. Fluorescence of the emulsion was monitored over two months to ensure that the emulsion and fluorescence yield were stable.

Activity assay and fatty acids standard curve

Activity assays were performed using different quantities (4.6 to 46.5 μg) of commercial Lipase A and two pure recombinant enzymes (lipase LipAT and carboxylesterase EstGtA2 prepared in our laboratory (13)). The enzymatic assays were performed in 96 well plates at pH 7 and 25°C using a BioTek Synergy™ Mx microplate reader. The enzymatic activities of Lipase A and LipAT were performed at different temperatures (25, 45 and 65°C) at pH 7, and at different pH values (5, 7 and 9) at 25°C. The enzymatic reactions were initiated by adding 2 μl of enzyme solution to 200 μl of

emulsion. The rate of hydrolysis was calculated from fluorescence emitted at 580 nm (excitation wavelength 350 nm) with a gain of 50. Emulsions without enzyme, and RhB-gum arabic with enzyme but without substrate, were also used as negative controls. Standard curves were constructed from changes in fluorescence intensity after the addition of increasing amounts of oleic acid (3-50 mM) to the RhB-gum arabic solution. The pH and temperature were adjusted for each standard sample. The fluorescence intensity measurements were performed using exactly the same conditions as those used for the activity assay. For reproducibility and precision, the sample preparations and measurements were carried out in triplicate. Polynomial equations were used to convert fluorescence emission changes into hydrolysis rate. One unit of activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of fatty acid per min/ mg of protein under our assay conditions.

Colorimetric assay using p-nitrophenyl ester

Lipase specific activity was determined spectrophotometrically by measuring the amount of *p*-nitrophenol (*p*-NP) released after hydrolysis of *p*-nitrophenyl stearate (*p*-NPC18). The substrate was prepared in acetonitrile. The standard reaction (0.2 ml) contained 100 μM of *p*-NPC18, 10% (v/v) acetonitrile, 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7) and 0.4 μg of enzyme. Gum arabic, 0.01% (w/v), was added in a manner to promote emulsification of *p*-NPC18. The reaction was performed in 96-well microplates. The production of *p*-NP was monitored at 405 nm using a Biotek Synergy™ Mx microplate reader. Specific standard curves using known amount of *p*-NP were measured under same conditions as those used for enzymatic reactions. One unit of activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of *p*-NP per min under our assay conditions.

Results and discussion

Determination of lipase activity using fluorescence from RhB olive oil emulsions

For this assay, RhB emulsified mixtures with and without olive oil (OO) were prepared as described under *Materials and Methods*. The stability of RhB-OOe (emulsified mixture) was monitored by measuring its fluorescence intensity. We found that the emulsified mixture can be stored at 4°C for to 2 months without any significant intensity change. All emulsions studied were excited at 350 nm (which corresponds to the typical wavelength emitted by a UV trans-illuminator) and were found to emit maximally at 580 nm. Background fluorescence from the RhB-gum arabic solution and RhB-OOe were recorded. It is important to note that RhB-gum arabic solution emits fluorescence significantly under our conditions, but this fluorescence was quenched when OO was added to the RhB-gum arabic mixture (data not shown). The quenching was relieved and fluorescence intensity increased when OO was hydrolysed releasing fatty acid and glycerol as shown in figure 1A. Fatty acids and glycerol, however, did not emit fluorescence at 580 nm when measured in the absence of RhB (data not shown).

Different quantities of Lipase A, ranging from 4.6 μg to 46.5 μg, were used with RhB-OOe to measure lipase time-dependent hydrolysis at 25°C and pH 7 (Figure 1A). As expected, hydrolysis of OO resulted in increased fluorescence intensity. As shown in figure 1A fluorescence intensity was correlated with the quantity of enzyme used. No increase in fluorescence intensity was observed when carboxylesterase EstGtA2 enzyme was used with the emulsion, since this enzyme is unable to hydrolyse olive oil (13). The same results were observed for RhB-OOe without enzyme and for RhB with enzyme but without substrate (data not shown). Standard curves for oleic acid in the presence of RhB-OOe were prepared and a linear regression was performed (Figure 1B) allowing the calculation of lipase activity. Quantification of the amount of fatty acid released after enzymatic hydrolysis was calculated (Figure 1C) using the standard curve generated using oleic acid. We recognize that when using a natural substrate such as OO, which may release various mixtures of fatty acids upon its hydrolysis (depending on the enzyme specificity), it is therefore difficult to construct a

representative standard curve that reflects the *precise* amount of *each* fatty acid released, correlated with lipase activity. Various mixtures of linoleic, oleic and other fatty acids for instance may not lead to the same exact change in polarity in the medium and consequently, in fluorescence intensity. Worth noting, olive oil's fatty acids possess similar biophysical chemical properties and should not lead to substantial differences in polarity, although one cannot exclude some variation. Consequently the relationship between product formation and RhB fluorescence emission intensity may vary depending on released fatty acid composition. When using a substrate such as olive oil that generates a mixed product, the method presented here is not exactly quantitative and activity cannot be precisely related to the amount of each fatty acid released. Thus, for a natural substrate such as OO, the method presented here, allows us to estimate lipase activity based on "fatty acid production", as reflected in the ordinate in figure 1c. This limitation associated with OO does not preclude using the method in a comparative mode, and remains fully applicable for screening experiments.

Nevertheless, to further demonstrate the robustness of the method we prepared another emulsion using triolein, a substrate that releases oleic acid only. Lipase A or LipAT (46.5 μg) was added to the emulsion and allowed to hydrolyse triolein at 25°C pH 7. The activity curves measured for Lipase A and LipAT are presented in figure 2. Lipase A has a higher activity, releasing larger amounts of oleic acid than LipAT as depicted in panel B. Specific activities (based on fatty acids or oleic acid production) of either lipases are very similar (about 80 U/mg) while the activity for Lipase A with triolein as a substrate reached 130 U/mg. This variation is likely attributed to a difference in substrate specificity since the only product generated with tiolein's hydrolysis is that used to construct the calibration curves.

Activity assays were performed using *p*-NPC18 in order to compare with the results obtained by our detection method. We used *p*-NPC18 to monitor activity because of the similarity of its carbon length chain when compared to OO or triolein. It was not possible to solubilise *p*-NPC18 to concentrations above 100 μM without the aid of a surfactant and organic solvent. Interestingly, gum arabic that we used for the RhB-OO

emulsion served as an efficient surfactant for this substrate and did not induce any obvious inhibitory effect on lipase activity using any of the substrates in this study. Tween 20, which is generally used for *p*-NP substrate solubilisation inhibited Lipase A activity (not shown). Specific activities (on the basis of p-NP) of 7.2 ± 0.4 (U/mg) for Lipase A and 11.2 ± 0.2 (U/ mg) for LipAT at pH 7 and 25°C were recorded. LipAT had the highest activity for this substrate, while Lipase A had the highest activity in the presence of triolein as shown above. Activities calculated using various substrates are in full agreement with the known preference of lipases for triacylglycerides over single-chain *p*-NP substrates (14).

RhB-OOe lipase activity detection under various conditions

We also verified that our method was suitable for lipase activity detection at different pH values and higher temperatures. Accordingly, standard curves at different pH values and temperatures (25, 45 and 65°C) were prepared (Figure 3A and Figure 4A). Clearly, both parameters had an important impact on the dependence between oleic acid concentration and RhB fluorescence. We measured the activities of Lipase A and LipAT at the pH and temperatures indicated (Figures 3B and 4B). Regardless of the reaction conditions selected, RhB-OOe was found to emit maximally at 580 nm. Typical kinetic curves have been observed at all temperatures and pH conditions for Lipase A and LipAT. The assay was readily performed at different pH values without noticeable impact on ease-of-use or reproducibility. However, it was noted that the reproducibility decreased when assays were conducted at pH values less than 5 (Figure 3B). As with most lipase activity detection, reactions should not be performed at pHs higher than 10, where saponification of triglycerides occurs regardless of enzyme activity (15). The assay was highly reproducible at high temperatures. Moreover, standard deviation was smaller at the beginning of the reactions, which aids in the determination of initial velocities and activity (Figure 4B).

Determination of lipase activity using RhB-OOe method

We determined specific activities for Lipase A and LipAT under various conditions as shown above using natural substrates and a high throughput approach (Figure 5). The specific activities obtained with our method are statistically significant and compatible with the expected behavior of these enzymes. LipAT maintains a specific activity at high temperature, consistent with the reported observation that a lipase extracted from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* was thermostable (16).

Conclusion

In this study, we improved on the earlier method of Jette and Ziomek for the determination of lipase activity by using a liquid emulsion. Using an emulsion lead to multiple benefits compared to a rhodamine-triglyceride-agarose plate gel. We demonstrated that our method is simple, rapid, sensitive and reproducible for determining lipase activity. The assay can be carried out using an automated pipetting station and a multi-well plate reader, making it fully compatible with a high throughput format. In addition, RhB emulsions allow for pH and temperature variations that cannot be achieved as easily when using solid agar plate assays. Our improved method is readily useable for screening lipase optimal activity conditions and for screening lipase variants generated via accelerated evolution experiments or revealed by metagenomic investigations of environmental samples.

Acknowledgments

X.Z. acknowledges a scholarship from Proteo (U. Laval, Canada). This work was supported by a NSERC Discovery grant awarded to M. B. The generous editorial assistance of Dr Joanne Turnbull is acknowledged.

References

(1) BCC Research, Global Markets for Enzymes in Industrial Applications (BIO030G), March 2012, URL link (4th august): http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-industrial-enzymes-surpass-$6-billion-2016

(2) Neelam Gurung, Sumanta Ray, Sutapa Bose and Vivek Rai. (2013) A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. BioMed Research International, ID 329121.

(3) Neena N. Gandhi. (1997) Applications of Lipases. Journal of the American Oil Chemists' Society 74, 621-634.

(4) Fariha Hasan, Aamer Ali Shah and Abdul Hameed. (2006) Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology 39, 235-251.

(5) Ole Kirk, Torben Vedel Borchert and Claus Crone Fuglsang. (2002) Industrial enzyme applications. Current Opinion Biotechnology 13, 345-351.

(6) Hans Leemhuis, Ronan M. Kelly and Lubbert Dijkhuizen. (2009) Directed Evolution of Enzymes: Library Screening Strategies. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life 61(3), 222-228.

(7) Rani Gupta, Pooja Rathi, Namita Gupta and Sapna Bradoo. (2003) Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnology Applied Biochemistry 37, 63-71.

(8) Namita Gupta, Pooja Rathi, and Rani Gupta. (2002) Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. Analytical Biochemistry 311, 98-99.

(9) Jean Francois Jette and Edmund Ziomek. (1993) Determination of lipase activity by a Rhodamine-Triglyceride-Agarose Assay. Analytical Biochemistry 219, 256-260.

(10) Mariana Carissimi, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia, Thais Furtado de Souza1, Valeriano Antonio Corbellini, Maria Lúcia Scroferneker. (2007) Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-Rhodamine B and tween 80. Tecno-logica 11(1), 33-36.

(11) Gisela Kouker and Karl-Erich Jaeger. (1987) Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. Applied and Environmental Microbiology 53(1), 211-213.

(12) David M. Charbonneau, Fatma Meddeb-Mouelhi, Maurice Boissinot, Marc Sirois and Marc Beauregard. (2012) Identification of Thermophilic Bacterial Strains Producing Thermotolerant Hydrolytic Enzymes from Manure Compost. Indian Journal of Microbiology 52(1), 41-47.

(13) David M. Charbonneau, Fatma Meddeb- Mouelhi and Marc Beauregard. (2010) A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: evidence for a new carboxylesterase family. The Journal of Biochemistry 148(3), 299-308.

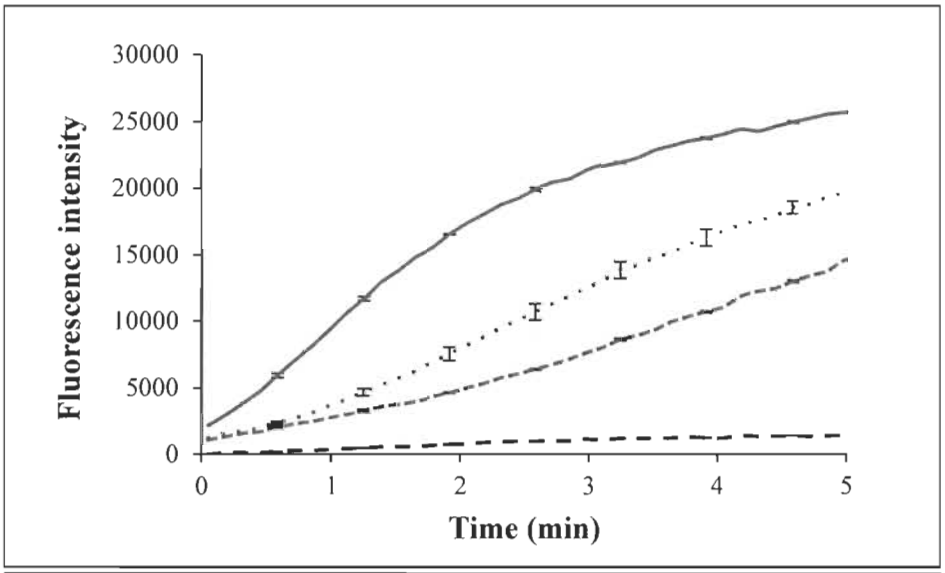
(14) Danielle Branta LOPES, Laira Priscila FRAGA, Luciana Francisco FLEURI and Gabriela Alves MACEDO. (2011) Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately. Ciência e Tecnologia de Alimentos 31(3), 608-613.

(15) D. Y. C. Leung and Y. Guo. (2006) Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. Fuel Processing Technology 87, 883-890.

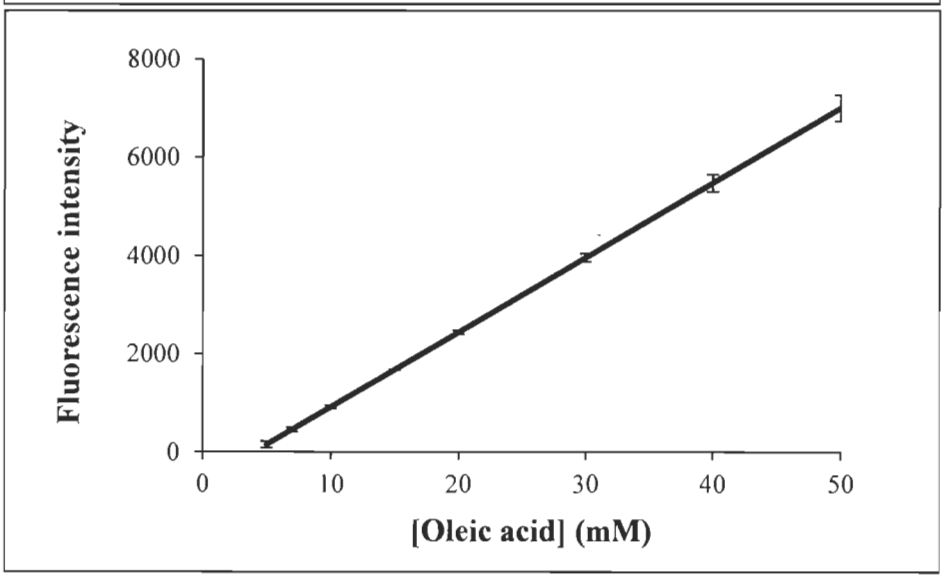
(16) Malihe Masomian, Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman, Abu Bakar Salleh, Mahiran Basri. (2013) A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. Process Biochemistry 48(1), 169-175.

Rapport-Gratuit.com

(A)


Fluorescence intensity
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
1
2
3
4
5
Time (min)

(B)


Fluorescence intensity
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
[Oleic acid] (mM)

(C)

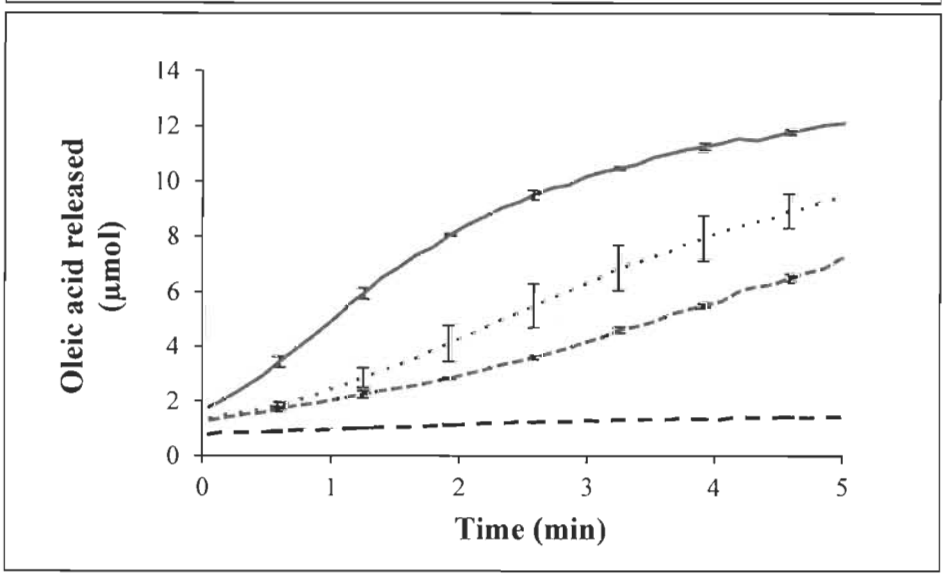

Oleic acid released (µmol)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
Time (min)

Fig. 1. Hydrolysis of olive oil by lipase A.

Panel A: Hydrolysis of olive oil in RhBOOe leads to fluorescence emission. **Panel B:** Calibration curve prepared with RhB-OOe using 5-50 mM oleic acid. **Panel C:** Quantification of fatty acid released by lipase A hydrolysis of olive oil. Excitation wavelength was set at 350 nm; emission was recorded at 580 nm. Experiments were carried out at pH 7 and 25°C. Enzyme quantities used were: 46.5 µg **(solid line)**, 23.3 µg **(dashed line)** and 4.6 µg **(dotted line)**. Carboxylesterase EstGtA2 was used as negative control (46.3 µg) **(dashed and dotted line)**. Results represent the mean of three separate values and standard error of the mean (SEM) was determined.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

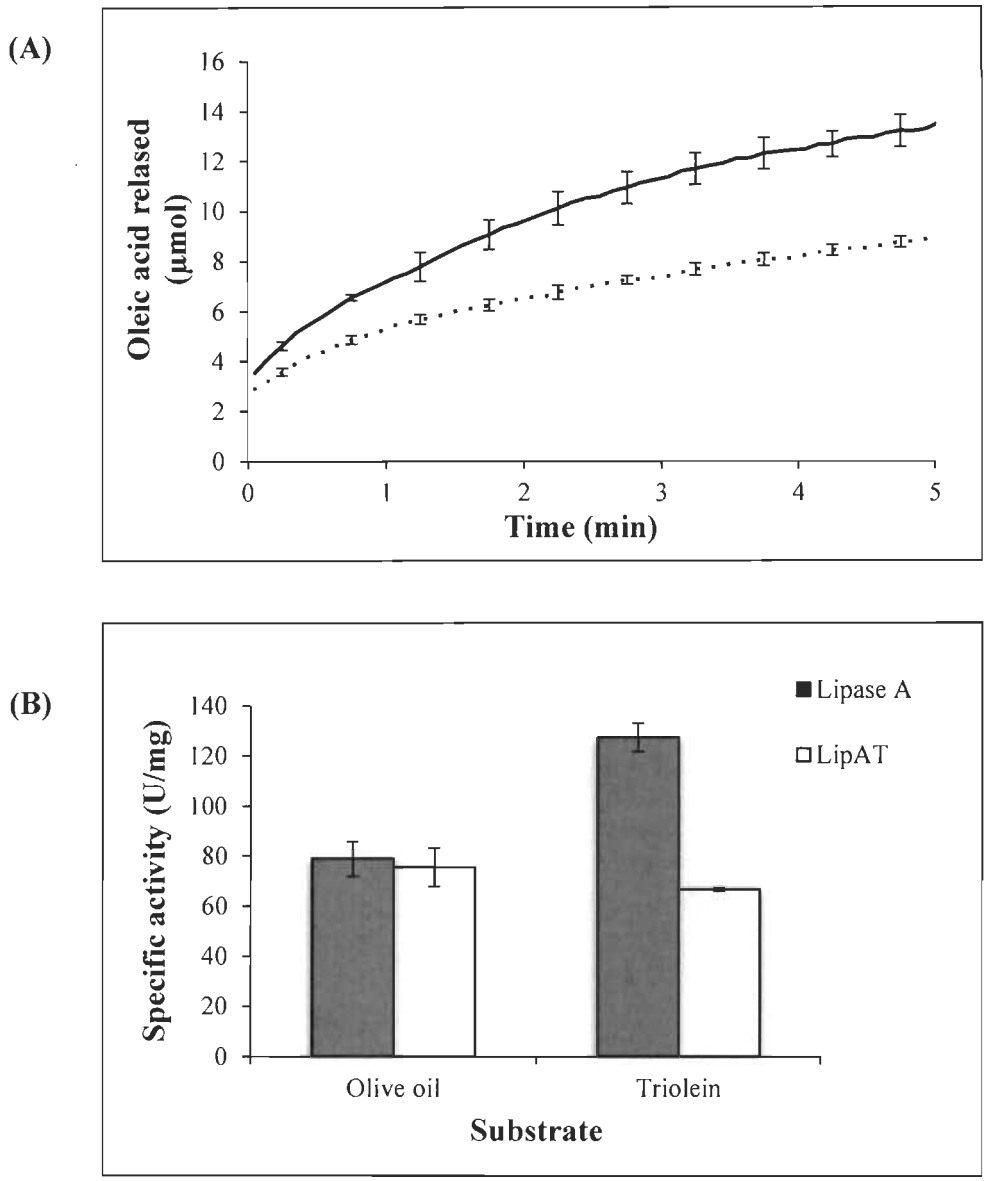


Fig. 2. Hydrolysis of triolein by lipases.

Panel A: Quantification of fatty acid released by lipases hydrolysis of triolein. The quantification has been measured by fluorescence emission when triolein in RhBOOe was hydrolysed. **Panel B:** Lipase specific activity using a pure substrate (triolein) and a natural substrate (olive oil). Excitation wavelength was set at 350 nm; emission was recorded at 580 nm. Experiments were carried out at pH 7 and 25°C. Lipase A **(solid line)** and LipAT **(dotted line)**. Results represent the mean of three separate values and standard error of the mean (SEM) was determined.

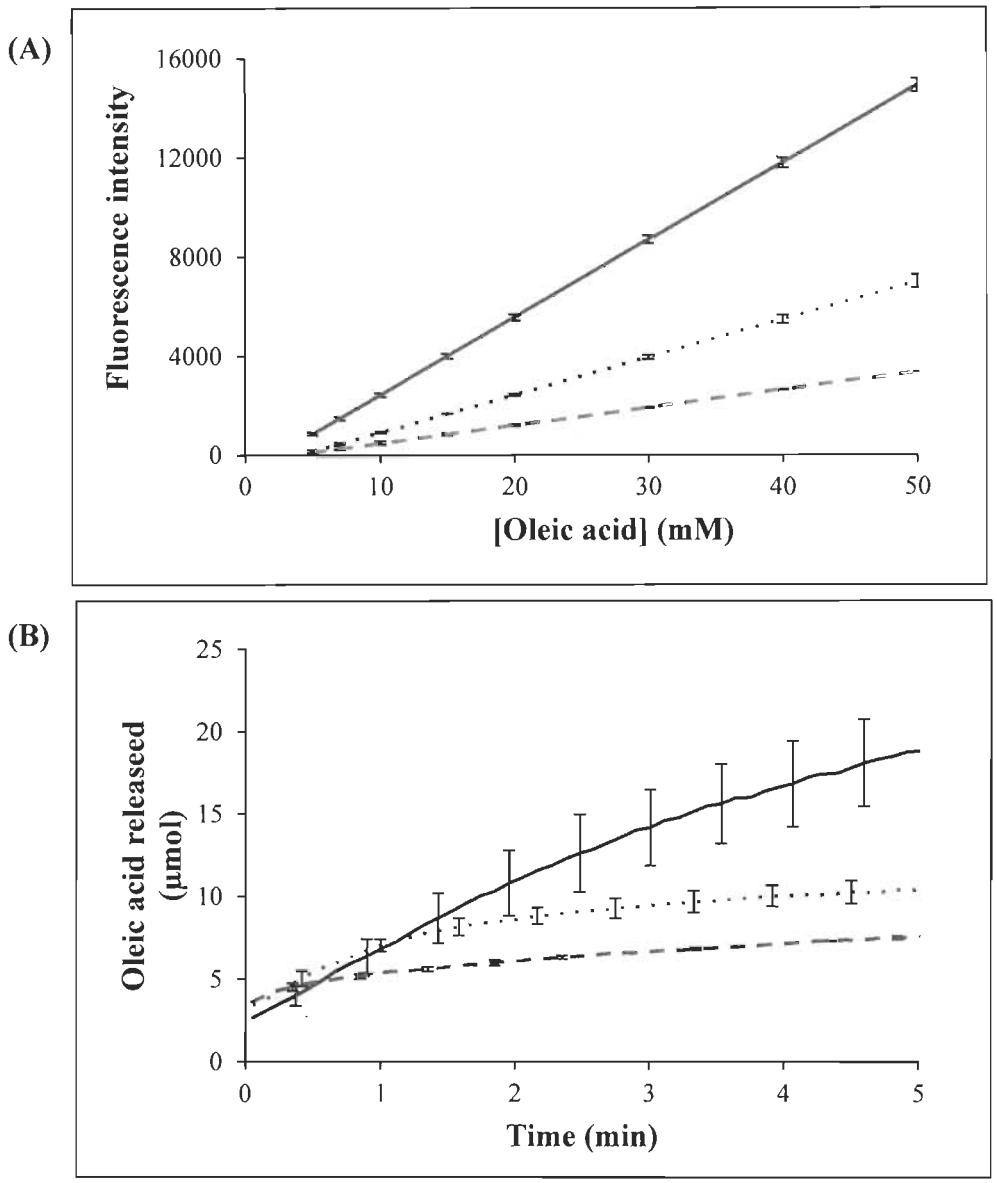
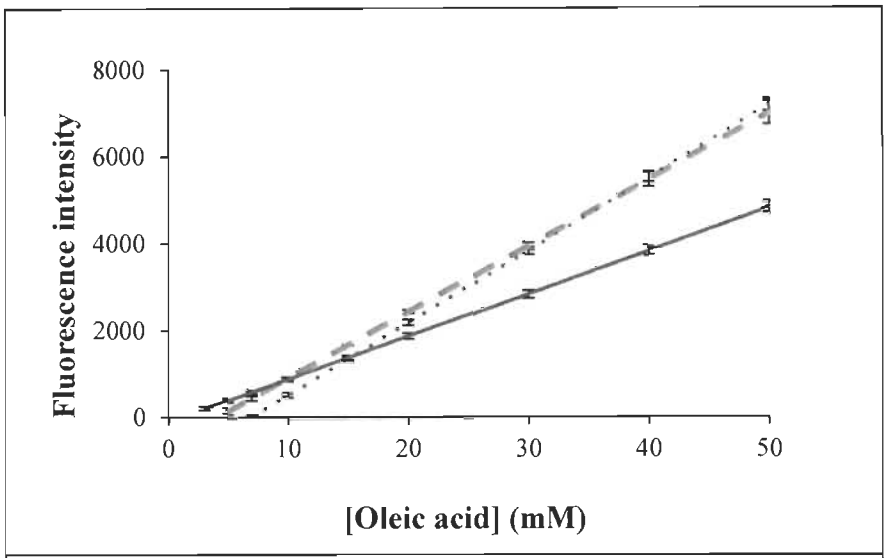
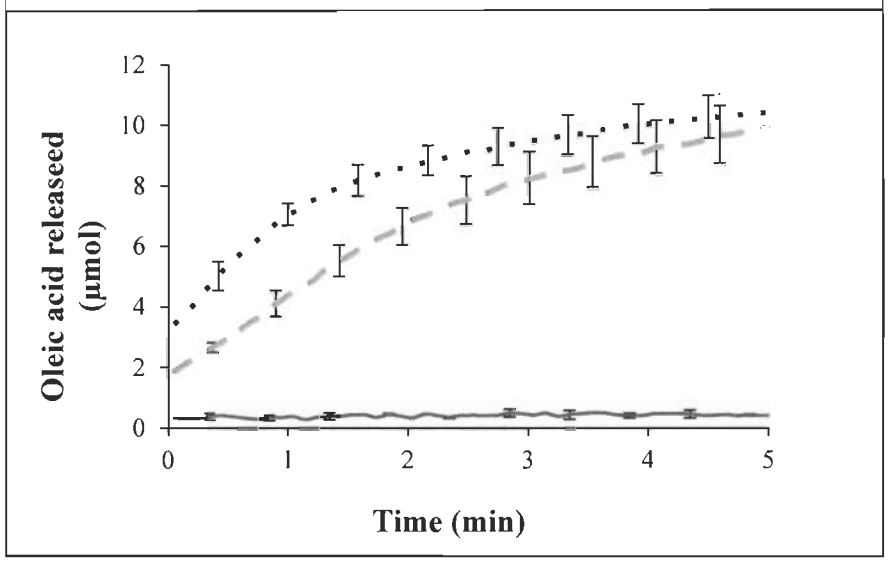


Fig. 3. Measurements of lipase A activity using RhB-OOe at different pH. Panel A: Calibration curves prepared with RhB-OOe using oleic acid 5-50 mM at 25°C and at pH 5 **(solid line)**, pH 7 **(dotted line)** pH 9 and **(dashed line)**. **Panel B:** Quantification of fatty acid released by lipase A hydrolysis of olive oil at 25°C and at pH 5 **(solid line),** pH 7 **(dotted line)** and pH 9 **(dashed line)**. Enzymes quantities were 46.5 µg/well. Results represent the mean of three separate experiments and standard error of the mean (SEM) was determined.

(A)


Fluorescence intensity
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
[Oleic acid] (mM)

(B)


Oleic acid released (µmol)
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
Time (min)

(C)

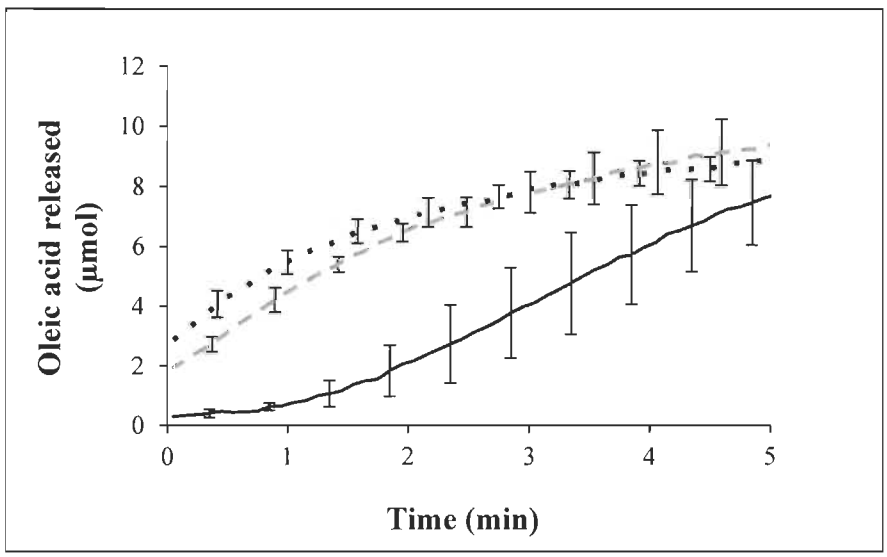

Oleic acid released (µmol)
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
Time (min)

Fig. 4. Measurements of lipase A activity using RhB-OOe at different temperatures.

Panel A: Calibration curves prepared with RhB-OOe using oleic acid 5-50 mM at pH7 and at 25°C **(dashed line)**, 45°C **(dotted line)** and 65°C **(solid line). Panel B:** Quantification of fatty acid released by lipase A hydrolysis of olive oil at 25°C **(dashed line)**, 45°C **(dotted line)** and 65°C **(solid line)**. **Panel C:** Quantification of fatty acid released by LipAT hydrolysis of olive oil at 25°C **(dashed line)**, 45°C **(dotted line)** and 65°C **(solid line)**. Excitation wavelength was set at 350 nm; emission was recorded at 580 nm. Experiments were carried out at pH 7. Enzymes quantities were 46.5 μg/well. Results represent the mean of three separate values and standard error of the mean (SEM) was determined.

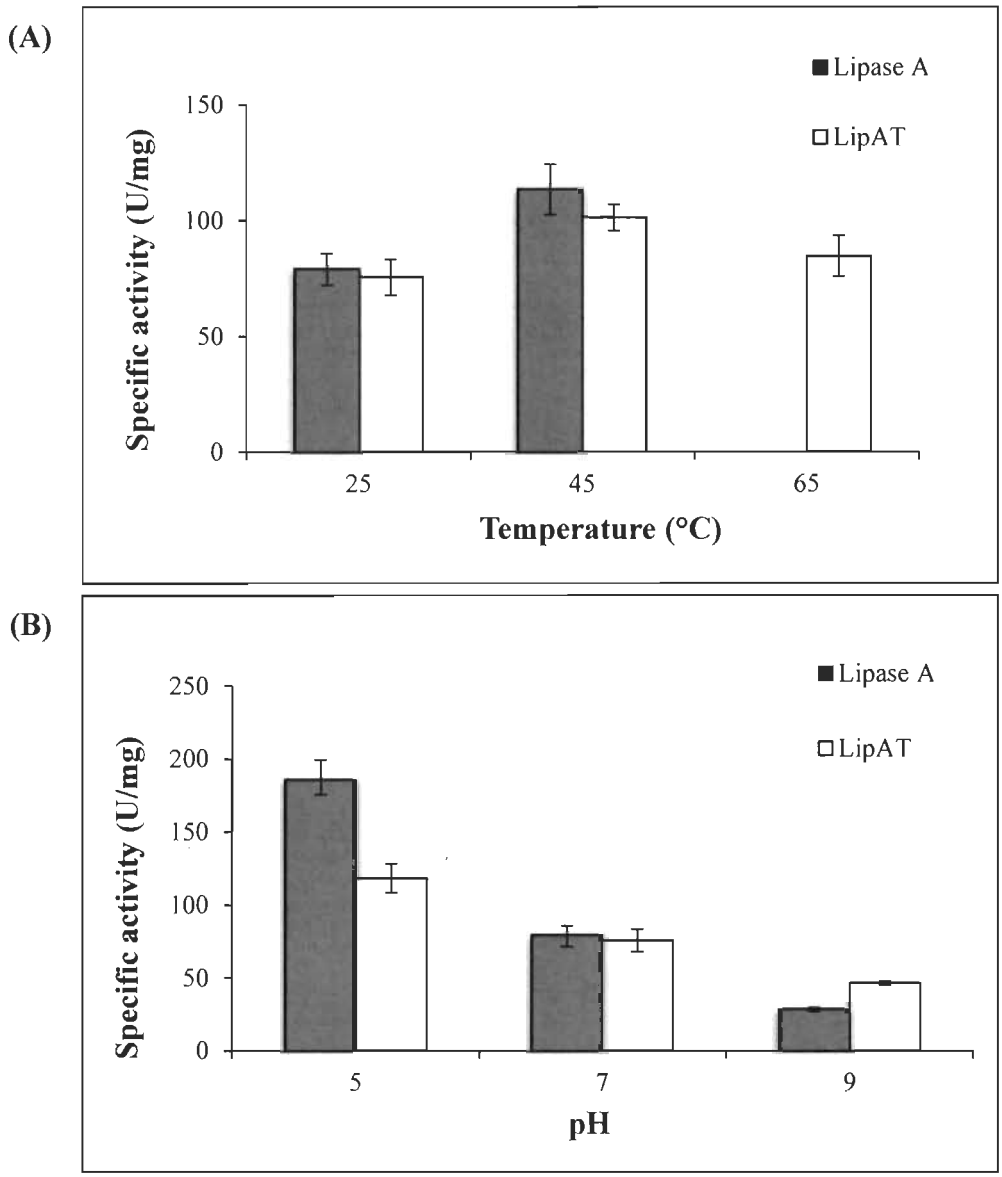


Fig. 5. Lipases specific activity determined using RhB-OOe.

Panel A: Different temperatures at pH7 (25, 45 and 65°C). **Panel B:** Different pH (5, 7 and 9) at 25°C. All the assays were carried with two different lipases, lipase A an industrial lipase and LipAT a recombinant enzyme that we have produced and purified. Excitation wavelength was set at 350 nm; emission was recorded at 580 nm. Results represent the mean of three separate experiments and standard error of the mean (SEM) was determined.

CHAPITRE III

CHARACTERIZATION OF A NOVEL ALKALOPHILIC LIPASE FROM *ANEURINIBACILLUS THERMOAEROPHILUS*: LID HETEROGENEITY AND ASSIGNMENT TO FAMILY I.5

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit en préparation qui sera soumis pour publication en anglais dans la revue « Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic ». L'article sera soumis vers la fin d'août 2016. La référence de cet article est la suivante :

Zottig X, Meddeb-Mouelhi F, Charbonneau D M et Beauregard M. Characterization of a novel alkalophilic lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus*: lid heterogeneity and assignment to family I.5.

3.1 Contribution des auteurs

L'ensemble des expériences à la base de cet article a été conçu par Ximena Zottig qui a aussi écrit le manuscrit. Ces recherches et l'ensemble des expériences ont été menés en étroite collaboration avec Fatma Meddeb et Marc Beauregard qui ont participé à l'écriture du manuscrit. David Charbonneau a contribué au clonage, à la préparation d'alignements multiples et aux analyses phylogénétiques. Guillaume Lemieux et Nikolas Beauchesne ont aidé au niveau de la partie expérimentale expérimentale.

3.2 Résumé de l'article

Des investigations récentes concernant une souche d'*Aneurinibacillus* ont permis l'identification d'une lipase avec une tolérance unique à certains solvants. Cette lipase se distingue des lipases connues par sa séquence (60 % d'identité de séquences des résidus d'acides aminés avec la famille de lipase la plus proche connue). Ce travail rapporte

l'expression et la purification de cette lipase (LipAT) ainsi que la première caractérisation de sa structure et de son comportement à haute température et à différents pH. LipAT a une teneur en structures secondaires compatibles avec la structure de type α/β- hydrolase et elle se retrouve en un état dimérique à un pH neutre. Cette enzyme conserve son état natif dans des pH de 5 à 10, et semble s'associer en agrégats structurés à des pH de 7 et 8. Probablement, cette suprastructure permet de protéger les structures secondaires de LipAT dans des conditions thermiquement dénaturantes. Ici, nous avons montré que l'enzyme est active à des températures de 25 °C à 65 °C sous pH neutre. Cependant, son activité maximale a été détectée à pH 10 et à 45 °C. La capacité de LipAT à résister à (ou à se replier après) des traitements à haute température a également été étudiée. Le chauffage à 70 °C à pH 10 suivi d'un refroidissement conduit à l'absence d'activité résiduelle, tandis que des traitements similaires effectués à un pH de 8 (où des agrégats peuvent être formés) a permis la récupération de 50 % de l'activité enzymatique initiale. Les analyses *in silico* ont révélé une forte conservation (85 % ou plus) pour les principales séquences de signature de lipase. Malgré cela, LipAT montre une faible identité de résidus (60 %) par rapport à la plus proche famille (I.5). Cette divergence implique la région du couvercle chez LipAT qui montre seulement 25 % d'identité avec les couvercles des lipases homologues les plus proches. Cette étude révèle que la comparaison des couvercles parmi les lipases des membres de la famille I.5 et LipAT devrait être une cible primaire pour l'élucidation, l'optimisation et la prévision des relations structure-fonction dans lipases.

3.3 Deuxième article scientifique

Characterization of a novel alkalophilic lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus*: lid heterogeneity and assignment to family I.5

Ximena Zottig[1,2], Fatma Meddeb-Mouelhi[1,2], David M. Charbonneau[3] and Marc Beauregard[1,2*]

[1] Département de chimie, biochimie et physique, Université du Québec Trois-Rivières, 3351 Boul. Des Forges, C.P. 500 Trois-Rivières (Québec) G9A 5H7, Canada

[2] PROTEO, Université Laval, 2705 Boul. Laurier, Québec (Québec) G1V 4G2, Canada

[3] Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montreal, Canada

[*] To whom correspondence should be addressed:
Marc Beauregard, Ph.D.
Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques
Université du Québec à Trois-Rivières,
C.P. 500, Trois-Rivières (Québec), G9A 5H7.
Tel: (819) 376-5011 # 3354
Fax: (819) 376-5084
E-mail: marc.beauregard@uqtr.ca

Rapport-Gratuit.com

Abstract

Recent investigations of *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strains allowed identification of a unique solvent tolerant lipase, distinct from known lipases (60% residue identity with nearest lipase family). This work reports the expression and purification of this lipase (LipAT) and the first characterization of its structure and temperature and pH-dependent behaviour. LipAT has a content in secondary structures compatible with the canonical lipase α/β hydrolase fold, and is dimeric at neutral pH. The protein was folded from pH 5 to 10, and association into folded aggregates at pH 7 and 8 likely protected its secondary structures from thermal unfolding. The enzyme was active from 25°C to 65°C under neutral pH, but its maximal activity was detected at pH 10 and 45°C. The ability of LipAT to recover from high temperature was investigated. Heating at 70°C and pH 10 followed by cooling lead to absence of activity recovery, while similar treatments performed at pH 8 (where folded aggregates may form) allowed recovery of 50% of the initial activity. *In silico* analyses revealed a high conservation (85% or more) for the main lipase signature sequences in LipAT despite an overall low residue identity (60% identity compared to family I.5 lipases). In contrast, the lid region in LipAT is very distinct showing only 25% amino acid sequence identity to other homologous lipases in this region. Comparison of lids among lipases from the I.5 family members and LipAT reveals that this region should be a primary target for elucidation, optimisation and prediction of structure-function relationships in lipases.

Summary statement

A novel microbial lipase was produced and characterised. Its optimal activity was observed at pH 10, but its ability to recover from heat stress was maximal at neutral pH, where secondary structures appear to be protected by aggregation.

Short title

Characterization of a novel alkalophilic lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus*

Keywords: *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, Alkalophilic Lipase, Structure, Enzyme activity, Industrial applications, Biodiesel synthesis.

Introduction

Lipases (triacylglycerol acyl hydrolases (EC 3.1.1.3)) are indispensable for the bioconversion of lipids in nature (1). These enzymes catalyze the cleavage of ester bonds releasing alcohols and carboxylic acids in aqueous media. They can also catalyze the formation of ester bonds in organic solvent or low water media. Lipases are considered polyvalent enzymes as they are able to catalyze the transesterification, interesterification, alcoholysis, acidolysis and the hydrolysis of acylglycerides (2). Moreover, lipases are multi-faceted because of the chemoselectivity, regioselectivity and enantioselectivity they display toward substrates. Although members of the lipase protein family show an overall low amino acid sequence identity, they share several structural motifs, most notably an α/β hydrolase fold that consists of a central β-sheet connected by α-helices, as well as a conserved catalytic triad within the active site. The catalytic triad of Ser-Asp/Glu-His contains the serine residue which is embedded in a consensus sequence of G-X-S-X-G (2). Lipases rely on interfacial activation, facilitated by a movable hydrophobic lid which covers the active site pocket. Movement of the lid allows the enzyme to switch from a closed, inactive conformation to an open conformation in the presence of a lipidic interface (3) allowing substrate binding. This configuration is particularly attractive for substrates lacking affinity for water.

Lipolytic enzymes which include esterases (EC 3.1.1.1) and lipases (EC 3.1.1.3) represent about 20% of the world enzyme market (7.6 G$ in 2015 (4)). Among them, microbial lipases have great potential as industrial biocatalysts as a consequence of their low production cost and widely diversified enzymatic reactions (5). These characteristics allow the application of microbial lipases in several fields such as the detergent, pulp & paper, food, pharmaceutical, cosmetic and biodiesel industries. For example, lipases that tolerate high pH are particularly relevant as detergent additives, which is one of the largest markets for industrial enzymes. High pH tolerance is encoded in the lipase amino acid sequence. Thus, a comparison of the primary structure of lipases with different pH tolerance can help identify key sequence regions that encode alkaline resistance within lipases. Understanding the structural elements responsible for lipase activity and

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

specificities under various conditions is essential for enzyme rational design, which is a powerful tool for improving biocatalyst properties (6).

In our laboratory we have identified a group of microbes producing lipases from compost. Among them a bacterial strain identified as *Aneurinibacillus thermoaerophilus* was named CMB-A1 (7). A similar strain found in Asia was shown to produce a unique thermostable and solvent tolerant lipase that may be encoded by gene GU272057 identified earlier in the *Aneurinibacillus thermoaerophilus* genome (DSM 10154) (8,9). However, there was uncertainty as to whether this enzyme was the product of GU272057 since the lipase was secreted from a wild type strain. In a very recent publication Masomian *et al.* 2016 (10) reported the expression of GU272057 gene product. This pioneering study features an extensive bioinformatics analysis but provides limited information on enzymatic properties (the only parameter published is the activity of a crude lipase extract at a single pH value). The lipase (named HZ lipase by this group after the strain found in Asia) is believed to be evolutionarily distinct from other lipases (60% residue identity to nearest known lipases from the classifications proposed earlier) and according to Masomian and colleagues, warrants the inception of a new I.9 subfamily (Jaeger classification). With only one report to date on lipase HZ (10), there is very little known about the enzymatic characteristics of the new putative I.9 subfamily. Thus, a structural and biophysical study of a purified LipAT lipase would be valuable to help evaluate predictions derived from *in silico* analyses.

Concomitantly to Masomian *et al.* 2016 (10), we cloned the lipase gene with accession number GU272057 and produced a high purity lipase named LipAT. Here, we report the biochemical and biophysical characterisation of this purified enzyme and provide the first evidence that lipase LipAT coded by GU272057 is a dimeric, alkalophilic and moderately thermophilic enzyme.

Materials and methods

Cloning of PCR products

The sequence GU272057 deposited in GenBank corresponding to *Aneurinibacillus thermoaerophilus* was used as a template for oligonucleotides design and directional cloning (10). The following primers with restriction sites (in bold and underlined) were synthesized:

LipAT-*Bam*HI F: 5′-ATATC**GGATCC**ATGCAAAAGGAAAGAAAAAATCAATA-3′ and LipAT-*Eag*I R: 5′-GAGTG**CGGCCG**TTATCTCACAGATAATGAACC-3′ and were used for the DNA amplification. PCR mixtures were prepared in 50 μl containing 1× Taq Buffer™, 200 μmol L^{-1} dNTP, 1.25 units Taq DNA polymerase (New England Biolab) and 0.4 μmol L^{-1} of the respective primers. Initial denaturation was performed at 95°C for 4 min. Amplification was carried out in 5 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 50°C and 2 min at 72°C followed by 25 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 58°C and 2 min at 72°C. The final extension step was achieved at 72°C for 10 min. The PCR product corresponding to LipAT open reading frame was purified using a Minelute PCR purification kit (Qiagen®) and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The PCR product was digested with *Eag*I and *Bam*HI restriction endonucleases for 16 h at 37°C, purified and then ligated (1 h at room temperature) into *Eag*I/*Bam*HI-digested pET-30a(+) expression vector (Qiagen®) using T4 DNA ligase. The pET-30/LipAT recombinant plasmid was then transferred into ultracompetent *E. coli* XL10-Gold cells (Stratagene®) using heat shock transformation. Transformed cells were selected on LB-agar with 50 μg/mL kanamycin. Plasmid DNA was isolated using a QIAprep™ kit (Qiagen®) and the integrity of the insert was verified by sequencing of the insert. Both strands of the recombinant LipAT gene were sequenced using the Biomolecular analysis platform (Université Laval). Sequence edition and analysis were performed with Clone Manager Professional Suite version 7.03.

Expression, purification and tag cleavage of recombinant LipAT

E. coli BL21(DE3)pLysS cells containing pET-30/LipAT expression plasmid were grown on Terrific Broth (LB) medium with 50 μg/mL kanamycin at 37°C with agitation at 175 rpm. Induction of recombinant lipase expression was performed by the addition of 0.5 mM IPTG to mid-log-phase cells (OD_{600} of 0.6-0.8) and subsequent incubation for 5 h at 25°C with shaking. Cells were then harvested and stored at -80°C. Thawed cells pellets were suspended in 15 mL of lysis buffer (50 mM sodium phosphate pH 8 containing 10 mM imidazole, 300 mM NaCl) and cell walls were disrupted by six sonication cycles of 60 sec at 200 W (Branson ultrasonic). The lysate was clarified by centrifugation for 30 min at 10,000*g*. His-tagged protein was purified under native conditions by affinity chromatography using a HisPrep FF16/10 (GE healthcare) column controlled by a Fast Protein Liquid Chromatography system (BioLogic DuoFlow™ Medium-Pressure Chromatography Systems, Bio-Rad Laboratories). The target protein was eluted using a gradient of imidazole (10 to 250 mM) in 50 mM sodium phosphate pH 8 buffer containing 300 mM NaCl. To remove salts and imidazole, purified LipAT was dialyzed twice against 4 L of 20 mM phosphate buffer pH 8 for 48 h at 4°C using a 3,500 kDa cut-off dialysis membrane. The hexa-Histag was cleaved by incubating 0.16 ng enterokinase light chain (NEB) with 25 μg of recombinant LipAT protein in a buffer solution (20 mM Tris-HCl pH 8 containing 200 mM NaCl and 2 mM $CaCl_2$) at room temperature for 4 h. LipAT was dialyzed twice against 4 L of 20 mM Tris-HCl pH 8 and twice against 4 L of 20 mM phosphate buffer pH 8. The protein was reapplied onto a HisPrep FF16/10 (GE Healthcare) column using a Fast Protein Liquid Chromatography system at pH 8. The flow-through which contained the untagged protein was dialyzed twice against 1 L of 20 mM phosphate buffer pH 8 and concentrated using Amicon® Ultra 10 K. Concentrated protein solutions were stored at -80°C using flash freezing. The molecular weight and purity of the protein were determined by SDS-PAGE using Bio-Rad low molecular range protein markers. Protein concentration was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard (11). An agar-rhodamine B plate assay with olive oil as a substrate was used to verify lipase activity after each purification step (12).

In silico analysis

Gene and protein data files for LipAT can be accessed using these accession numbers: GU272057, ADC84241.1 or WP_057900039. Based on an amino acid sequence identity of 50% or greater, a collection of LipAT homologs was identified with BLASTP using the non-redundant protein database and the Protein Data Bank via the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (13). Multiple sequence alignment (MSA) was performed using Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustal/) with the closest and/or crystallized homologues of LipAT (ADC84241). Conserved motifs were identified in the LipAT sequence and compared with homologous lipases as described by Chakravorty *et al.* 2011 (14).

A model of LipAT 3D structure was predicted by homology modelling using CHIMERA (15). The crystal structure of T1D311E Lipase from *G. zalihae* (PDB code 3UMJ) was used as template (16). The best model was chosen between five models by basic scoring with zDOPE and GA341. Image of the resulting 3D model was generated using Pymol (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA) and the quality of the model (geometry and stereochemistry) was evaluated by MOLProbity and PROCHECK analyses (17,18) available in the Swiss-Model workspace (19).

Circular dichroism spectroscopy

Far-UV (178-250 nm) and near-UV (250-320 nm) CD spectra were recorded at room temperature in 0.1 and 1 cm quartz cells, respectively, using a Jasco J-720 spectropolarimeter under nitrogen atmosphere. Protein samples (0.5 mg/mL) were reconstituted in 20 mM citrate (pH 5) or sodium phosphate (pH 6-9) or sodium carbonate (pH 10). The data were converted into molar ellipticity taking into account the path length and the molar concentration of residues (0.0045 M) after subtracting signal from the corresponding buffer. The protein secondary structures were calculated using CONTIN and reference protein set SP37 (185-240 nm) (20, 21). Thermal unfolding transitions were measured with a 1 mm path length quartz cell using a Peltier

thermostated cell holder (Jasco PTC-423S). The unfolding transitions were monitored by changes in ellipticity at 222 nm between 25 and 104°C upon heating at a rate of 0.8°C/min. Conformational transitions were fitted using a nonlinear least squares fit assuming a two-state model (fold and unfolded) with sloping pre- and post-transitional base lines (22). Extrapolation and least-square analysis from the pre- and post-transition regions allowed determination of the equations for *yF* and *yU*. The equilibrium constant was determined at each temperature and the thermodynamic parameters were determined according to the following equations (23):

$$f_U = (y_F - y)/(y_F - y_U) \tag{1}$$

$$K = f_U/(1 - f_U) = f_U/f_F = (y_F - y)/(y - y_U) \tag{2}$$

The free energy change associated with thermal unfolding was calculated at each temperature by the following equation:

$$\Delta G = -RT\ln K = -RT\ln[(y_F - y)/(y - y_U)] \tag{3}$$

The apparent *Tm* values were then determined by plotting ΔG as function of temperature where $Tm = T$ at $\Delta G = 0$, the midpoint of thermal unfolding curves, where $\Delta G(Tm) = 0 = \Delta Hm - Tm\Delta Sm$. This relationship gives parameters to calculate the free energy change at any temperature $\Delta G(T)$:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m(1 - T/T_m) - \Delta C_P[(T_m - T) + T\ln(T/T_m)] \tag{4}$$

Such calculations were carried out for the sole purpose of determining *Tm*. The standard deviations for *Tm*, calculated from the analysis of the individual melting profiles, were smaller than 0.1°C.

Fluorescence spectroscopy

Protein intrinsic fluorescence was measured using a Carry Eclipse spectrofluorimeter (Agilent Technologies) using a 1 cm quartz cell. Fluorescence spectra were collected from 300 to 400 nm with an excitation wavelength of 295 nm at room temperature and using excitation and emission bandwidths of 5 nm. The protein concentration used for fluorescence measurements was 0.05 mg/mL in 20 mM phosphate buffer pH 8.

Dynamic light scattering analysis

Light scattering measurements were carried out using a DynaPro NanoStar (Wyatt technology). Protein solutions of 2 mg/mL at pH 8 were filtered into clean and dust-free cuvettes through 0.1 µm cut-off filters. The refractive index (RI) value used for the solvent was 1.33 at 589 nm and the viscosity of the sample was assumed to be 4,0 cp. Protein molecular weight was calculated from the particle radius assuming they were globular. Stability measurements were carried out at 25°C in disposable cuvettes using a sample volume of 10 µL. The experiment involved a set of 3 x 15 sec acquisitions. Thermal denaturations were carried out in a micro quartz cuvette (1 µl-DPN from Wyatt technology) using a sample volume of 10 µL at 2 mg/ mL at pH 7 to 10. Protein samples were covered with 20 µL silicone to avoid evaporation. Denaturation was induced at a heating rate of 0.8°C/min and 5 x 5 sec acquisitions were recorded at every degree. All samples were measured in triplicates and the mean value was reported. The maximal temperature was limited to 65°C due to experimental constraints.

Enzyme activity measurement

Enzymatic assays for the determination of optimum pH and temperature were performed as described by Zottig *et al* 2015 (24). Commercial thermostable Lipase A from Buckman North America was used as a control. Enzymatic activities of LipAT and Lipase A were assayed at different temperatures (25, 35, 45, 55 and 65°C) and at different pH values (5 to 10). Assays were carried out in 20 mM citrate (pH 5), sodium phosphate (pH 6 to 9) and carbonate buffers (pH 10). The standard reaction (0.2 mL)

contained a rhodamine B-olive oil emulsion mixture (24) with 24 μg of purified enzyme for assays conducted at pH 5, 6, 7, 8 and 9, and 0.6 μg of protein at pH 10. The reaction was performed in 96-well microplates using VWR heating blocks. Enzymatic reactions were monitored using BioTek Synergy Mx microplate spectrophotometer. The rate of hydrolysis was calculated from fluorescence emitted at 580 nm (excitation wavelength was 350 nm). Enzymatic activity was also measured in 50 mM phosphate (pH 8) in order to verify the impact of the buffer concentration. Standard curves of fluorescence intensity versus fatty acid concentrations were recorded as described by Zottig *et al.* 2015 (24) for all pH and temperature values cited above.

Lipase thermal stability measurements

The effect of preincubation at various temperatures (70, 80, 90 and 100°C) on lipase activity was determined. Enzymes concentration was set at 24 μg/0.2 mL of protein for measurements at pH 8 and at 0.6 μg/0.2 mL for measurements at pH 10. After preincubation at the specified temperature and pH for 15 min, the enzyme was then incubated at room temperature for an additional 15 min to allow protein refolding. Activity was measured at 45°C, pH 8 and 10. Activity of the enzyme preincubated at room temperature was defined as 100% relative activity.

Effect of metal ions

The effect of metal ions on lipase activity was determined by adding Ca^{2+}, Cu^{2+}, K^{+}, Na^{+} or Mg^{2+} individually to the substrate mixture at final concentrations of 1 mM and 5 mM. Enzymatic activity was measured at optimal pH and temperature (pH 10 and 45°C) using 0.6 μg/0.2 mL of enzyme. The lipase activity in the absence of metal ion was defined as 100%.

Biodiesel synthesis assay

The ability to catalyse transesterification was investigated using triolein and methanol as substrates. The molar ratio of oil to methanol was varied from 4:1 to 3:1, and water was added in amounts corresponding to 30 and 50% of substrate by weight. The reaction was performed at room temperature and 45°C with shaking at 180 rpm. Silica chromatoplates (gel IB, Baker-Flex) were used as the stationary phase for thin layer chromatography (TLC) migration and a mixture of hexane-ethyl acetate (90:10 v/v) was used as the mobile phase. Substrate alone and products alone were used as controls. Samples and controls were normalized in acetone and one or two microliters were then applied to the origin of the chromatographic plates. Phosphomolybdic acid (PMA) staining was used for developing the transesterification activity on TLC plates. The PMA stain solution was prepared using 10 g of tetrahydrate ammonium heptamolybdate, 94 mL of water and 6 mL of sulfuric acid.

Results and discussion

Production and purification of LipAT enzyme

Recombinant LipAT was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS as a hexa-His-tagged fusion protein and purified to near homogeneity at a yield of 36 mg/L of culture. A single band at the expected molecular weight of ~ 45 kDa, or at ~42 kDa after cleavage of the His tag, was detected by SDS-PAGE (Figure 1A). Positive lipase activity of pure enzyme was verified using rhodamine- olive oil petri dish (Figure 1B).

Biophysical characterisation of LipAT

Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed at pH 8 (20 mM phosphate buffer) to determine the enzyme's radius and estimate its molecular weight at room temperature. Scattering was compatible with a dominant hydrodynamic radius component of 3.9 nm accounting for 99% of the mass detected (data not shown).

Rapport-Gratuit.com

Such value allows estimating a molar mass of 85 kDa for LipAT, compatible with a dimeric quaternary structure for LipAT under the experimental conditions provided.

The global secondary structure of LipAT was investigated by far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy. The molar ellipticity in the far-UV region (180-240 nm) showed a typical spectral shape observed for α/β structures (Figure 2), where the helical doublet (208 nm and 222 nm) is fused with the β single band at 215 nm, leading to a flatter signal at 215 nm then expected from predominantly helical peptides. On the basis of these spectra secondary structures were calculated for LipAT using CONTIN (21), giving residue based percentages of 30% α-helices, 20% β-sheets, 17% turns and 33% unordered regions. This analysis is compatible with the canonical lipase fold. Results in figure 2 experimentally confirm the earlier prediction regarding the secondary structure content proposed for the GU272057-encoded protein which was based on structure modeling (10). Thermal denaturation of LipAT was probed by monitoring ellipticity changes at 222 nm as function of pH and temperature (Supplementary material Figure S1). The unfolding of LipAT's secondary structures was not achieved at pH 7 and 8 despite heating the protein to 100°C, which precluded melting temperature (*Tm*) calculations (Figure S1). At pH 10, however, complete denaturation of LipAT was observed and yielded a *Tm* value of 50.6°C. In order to avoid the possible contribution of aggregation in LipAT behavior at neutral pH, the variable temperature experiments were repeated in the presence of a moderate concentration of urea (2 M). *Tm* values calculated in the presence of urea ranged from 37 to 86°C, between pH 5 and 10. As shown in figure 3, the highest melting temperature was recorded at pH 7 (*Tm* of 86°C) and the lowest values were recorded at the pH extremes of 5 (*Tm* of 40°C) and 10 (*Tm* of 37°C). Incubation at pH 4 and 11 did not allow for native folding of LipAT at room temperature (as deduced from shape of CD spectra, data not shown). Comparison of *Tm* values measured at pH 10 indicated a decrease in melting temperature by about 8°C when urea was added. This suggests that urea was effective in reducing aggregation which leads to the very high *Tm* values recorded at pH 7 and 8, but did not prevent LipAT folding. No increase in β-sheets content was detected when comparing spectra from native and heated proteins, at all pH tested.

Protein aggregation of LipAT during thermal denaturation was further analyzed by DLS (Supplementary Figure S2). At pH 7, 8 and 9, heating promoted the aggregation of LipAT into very large particles as evidenced by an exponential increase in the protein's radius commencing at 60 to 65°C. This suggests that the resistance of secondary structures to heat-induced unfolding at pH 7 and 8 may be attributed to some organized aggregation where secondary structures would be preserved. At pH 10, aggregation was triggered at a lower temperature, which is in keeping with the reduced *Tm* value recorded at this pH as revealed by CD measurements. The size of aggregates formed at pH 10, however, remained at about 25 nm from 55°C to 65°C. The DLS data did not permit qualification of such aggregates (are they amorphous or amyloid-like?) but clearly point to a pH-controlled associative process in LipAT. An aggregated state with improved stability at high temperature was observed for a related lipase (named BTL, 57% residue identity) from *Bacillus thermocatenulatus* (25). These authors noted that BTL's global secondary structure shifted from predominantly helical to β strands at high temperature, which is in contrast with LipAT that retained a very similar CD spectrum despite extreme heating at pH 7 or 8 (data not shown).

Characterization of LipAT's aromatic residues was pursued using CD spectroscopy in the near UV range (320-250 nm). No significant ellipticity was recorded in this wavelength range (data not shown) which suggests that there is no asymmetric environment restraining aromatic side chains in LipAT. This result is somewhat unexpected considering the large number of tryptophan residues (14 Trp) in this lipase. This apparent discrepancy was further explored by fluorescence measurements. Maximal fluorescence intensity was recorded at 345 nm after excitation at 275 nm. Such value indicates a high proportion of hydrated, solvent exposed aromatics, which is in agreement with the lack of rotational constraints for Trp residues suggested by near UV CD analyses (data not shown).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Enzymatic characterization

LipAT enzymatic activity was monitored at different pH and temperatures using a natural substrate (olive oil). We also performed activity measurements under similar experimental conditions using lipase A, a robust commercial lipase from Buckman North America, which served as a control enzyme). As shown in figure 4, LipAT was active over a wide range of pH values (7 to 10) and temperatures (25 to 65°C). It behaved similarly to lipase A at pH 5, 6, 7 and 8, at the same temperatures (data for pH 5, 6 and 9 not shown). Activity measurements recorded at pH 10 and 45°C, however, clearly distinguishes the two lipases; LipAT showed a much higher activity (1390 U/mg) than that measured for lipase A (not detectable at pH 10, at any temperature tested). Although LipAT outperformed lipase A at pH 10 and 45°C, LipAT did not resist inactivation when the temperature reached 65°C. The onset of association/aggregation observed for LipAT at pH 10 commenced at 55°C (see Supplementary Figure S2), which may explain why its activity was optimal at 45°C and completely lost by 65°C. The absence of any lipase A activity at pH 10 confirms that there was no substrate auto-hydrolysis at alkaline pH under our assay conditions. An earlier investigation of the corresponding HZ lipase reported that optimal conditions for activity were pH 7 and 65°C. No other pH was tested in (10), the lipase they used was not purified, and here we used a rhodamine B emulsion for assays. Thus, a rigorous comparison of our respective conclusions on optimal conditions for activity is impossible.

An important aspect of enzyme application potential is the ability to withstand changes in temperature, especially increase in temperature due to process parameters variations. The ability of LipAT to refold or recover from thermally-induced changes was investigated. To this end we incubated the enzyme at different temperatures (70, 80, 90 and 100°C) at pH 8 and 10 for 15 minutes, followed by cooling prior to 25°C for 15 min, and by activity measurements at 45°C (Figure 5). When LipAT was heated and tested at pH 8, a temperature of 70°C led to a 50% reduction of initial activity compared to when no heating was applied. Similarly, heating at 80°C led to an 80% loss of activity, while no residual activity was detected after heating at 90 and 100°C. In contrast at pH 10, all

enzyme activity was lost when LipAT was incubated at any of the specified temperatures and cooled prior to activity measurements. This thermally-sensitive behavior is not unexpected: the lowest *Tm* values calculated from CD experiments were recorded at pH 10 (Figure 3). Additionally, at this pH, aggregation of LipAT was detected commencing at 55°C when measured by DLS. At pH 8, in contrast, global secondary structures appeared resistant to denaturation at 100°C, and protein association did not commence until 60°C. The superior resistance of LipAT to heat at pH 8 versus pH 10 as monitored by both protein unfolding and aggregation can account for LipAT's ability to better recover from heat stress at pH 8. In order to further investigate lipase residual activity, the protein was heated at pH 8 but its activity was then tested under optimal conditions (pH 10 and 45°C). Recovery of activity was noticeably more successful when LipAT was heated at pH 8 but assayed at pH 10. The enzyme lost only 17 %, 23% and 32% of its activity after heating at 70°C, 80°C and 90°C, respectively. Heating at 100°C reduced the activity by 90%. Thus, it appears that the stabilisation afforded by structured aggregation at pH 8 and the intrinsic superior enzymatic activity at pH 10 both contributed to this significant recovery of activity after heating. These results are compatible with Masomian *et al.* study where the ability of lipase HZ to recover from heating at 50°C and pH 7 was reported (10). We show here that such conditions may prevent secondary structures. Considering the temperatures (45 to 55°C) that favor LipAT activity, this enzyme appears to reside in the lower tiers of what is considered thermophilic for many enzymes. But its thermostability at pH 7 and 8, however, is important for potential applications at neutral pH where temperature changes are to be expected.

In order to evaluate the impact of metal ions on LipAT activity we measured lipase activity in the presence of two different concentrations (1 and 5 mM) of five metal ions (Ca^{2+}, Cu^{2+}, K^{+}, Na^{+}, Mg^{2+}) at LipAT optimal conditions (pH 10 and 45°C) (Figure 6). No significant differences were observed when comparing 1 mM and 5 mM of any metal ion (5 mM data not shown). Results showed that Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} and Na^{+} enhanced LipAT activity, enhancing activity by 6%, 20%, 24% and 32%, respectively. In contrast, Cu^{2+} showed a dramatic inhibitory effect on lipase activity with 100% of

activity lost at either concentration. Many lipases from *Bacillus* or *Geobacillus* strains are inhibited by copper and stimulated by calcium (26, 27).

Potential industrial application: Biodiesel synthesis

Considering that high pH alone can promote triglyceride hydrolysis and transesterification, it is logical that alkalophilicity should be a prime criterion in choosing a lipase for biodiesel production (28). Here we used a pure natural substrate (triolein) to test LipAT's ability to catalyse transesterification. To this end, several combinations of reaction conditions were compared, by varying the amounts of triolein, methanol and water. No enzymatic reaction was detected in the absence of enzyme (absence of transesterification) but the hydrolysis reaction occurred when methanol was omitted (enzyme catalysed hydrolysis) from the solution. When all required ingredients were added, a biodiesel spot was detected by TLC analysis suggesting that our lipase efficiently catalysed biodiesel production. The conversion was incomplete under our conditions however (Supplementary Figure S3).

In silico characterization

In this section we attempt to complete the *in silico* investigation published by Masomian *et al.* (10) by focusing on aspects that were not discussed therein. A 3D model is provided (Supplementary material, Figure S4) in order to identify the location of the conserved domains identified in table 1. The model was built by homology using the crystal structure of the lipase from *Geobacillus zalihae* mutant D311G (PDB 3UMJ) as a template. The model is comparable with that proposed by Masomian *et al.* 2016 (10) (that was based on three different crystallized structures) and also suggests the existence of a classical α/β hydrolase fold, which is compatible with CD evidence reported here. The 3D models (this work and reference 10) show that the amino acid residues Ser113, Asp308 and His350 are arranged in the canonical catalytic triad-like configuration. Importantly, this homology model allowed the determination of the primary sequence of the lid domain within LipAT predicted structure (Table 1).

Multiple sequence alignment of proteins within the lipase family I.5 (Supplementary material Figure S5) allows identification of key structural motifs important for the function of these biocatalysts (Table 1). In order to compare regions that correspond to experimentally localised residues, we included the closest crystallised relatives of LipAT in addition to the sequences of the top protein data sets as identified by BLAST. The percentage of amino acid identity varied from 57 to 63% (closest relative available in NCBI Non-redundant protein sequences database and Protein Data Bank). Then a phylogenetic tree was constructed (Supplementary material Figure S6), which suggests that LipAT is at the junction between a well characterised clade of thermophilic enzymes, named here *Geobacillus* clade ("G clade"), and a less well studied group of lipases forming a clade that we named *Bacillus* ("B clade"), for sake of simplicity. Both clades belong to the same sub-family I.5 (Arpigny and Jaeger (29)) or abH15.01 (Lipase Engineering Database by Fischer (30)). Analysis of the MSA reveals conservation of the most characteristic regions associated to "true" lipases (Jaeger's family I): the GXSXG (active site serine), the oxyanion hole, P-loop motifs and Zn-binding domain are found in all sequence analysed. Table 1 reveals that these motifs are readily identified in the LipAT sequence (except for the lid) where the majority of residues correspond to signatures studied by Chakravorty *et al.* 2011 (14). Despite the resemblance, small variations in these motifs are informative. LipAT has a two-residue variation in the GXSXG motif compared to the crystalized and closest homologues from the *Geobacillus* group, where the typical AHSQG of the homologues is now GHSMG in LipAT. Here, an alanine is replaced by a glycine (non-polar to non-polar) and a glutamine is now a methionine (polar to non-polar). The latter amino acid replacement is also present in LipPf (from *Pelosinus fermentans*) which, like LipAT, is not included in either the G or B clade in the proposed tree. Worth noting, these amino acids are important for lipase activity since they surround the serine nucleophile that attacks the ester substrate. Additionally, the GHSMG motif is also common to the *Bacillus* group, in support of a distinct evolutionary branch as suggested by the phylogenetic tree. Masomian and colleagues recently suggested that the lipases from the B clade and LipAT be identified as member of a new sub-family I.9 (10). Residues of the oxyanion hole are important for stabilizing the oxyanion intermediate formed in the acyl enzyme.

Similar observations can be drawn for this motif. In LipAT, the third and fifth residues in the motif are Val, rendering the sequence distinct from both the G clade (containing Ile3/Val5) and the B clade (containing Val3/Leu5) as shown in table 1. This mutation may be of limited impact on its overall properties, however. The P-loop motif reveals the intermediary status of LipAT and LipPf. The Ala or Lys in position 3 of the G group lipases is replaced by a Ser in LipPf and then to an Asp in LipAT. The B clade lipase features Asp or isosteric Asn at the same position, implying that the modification of P-loop motif of LipAT (compared to the G clade) is conserved in the B clade. Similarly, in the Zn-binding domain residue 6 shifts from Ala to Thr when going from the G group to LipPf, then to Glu in LipAT and in lipases from the B clade. These observations support the proposal that LipAT and clade B lipases belonged to a new sub-family (10).

The lid domain covers the active site pocket and has been reported to modulate enzyme activity through domain movement. Interestingly, of all of the lipase motifs identified, the sequence of the lid domain in LipAT is very distinct. For example, group G and group B harbor lids whose sequences are conserved within either clade, but that are very different when comparing clades. Very few residues have equivalent positions in both clades, which include the Ala polymer and a Lys residue midway through the domain sequence. Both lids feature a large number of helix forming, non-polar residues, however. LipAT presents unique residues in positions 1, 7, 8, 9, 10, 15 and 18 that do not match the lid signature of either clade G or B. A comparable level of uniqueness is observed for LipPf lid sequence. The lids predicted for LipAT and LipPf are very different from either B or G groups and do not support their assignment to either clade or a new sub-family I.9. While the other motifs were much better conserved than the overall 60% residue identity calculated for all lipases versus LipAT, the lid domain shows very limited relatedness (only 24% sequence identity). Thus, the sequence of the LipAT lid domain is markedly different from the sequences found within the crystalized homologues and therefore deserves in-depth analysis. In particular, the lid domain involved in interfacial activation has been shown to be prime target site for improving thermostability, activity and modifying specificity via mutagenesis (31-33). It has been reported that the thermal stability of the lid helix is a critical issue for activity at high

temperatures (14). The unique composition of the LipAT lid identified here also may be key in determining this lipase's high activity at high pH.

Conclusion

This study presented the first biochemical and biophysical characterization of a lipase encoded by the GU272057 gene found in *Aneurinibacillus thermoaerophilus*. We have examined the enzyme's ability to catalyse hydrolysis reactions at high pH and the pH-controlled stabilisation of its secondary structure. The analysis of lipase motifs and their comparison with related lipases has identified the lid region of the active site as a distinctive feature of LipAT. Permutation of the lid sequences identified here in various lipases may shed some light on the properties that are linked to lid composition in lipases from family I.5.

Acknowledgments

X.Z. acknowledges a scholarship from CRMR (U. Laval, Canada). The editorial help of Pr. J. Turnbull in preparing this manuscript is acknowledged.

Declaration of interest

None.

Funding information

This work was supported by a NSERC Discovery grant awarded to M.B.

Author contribution statement

X.Z. carried out all experimental work and wrote the initial draft. F.M. collaborated to production and purification protocols, and performed editorial work. D.C. collaborated to the *in silico* analyses and performed editorial work. M.B. supervised the research and wrote the final version of the manuscript.

References

(1) Wakhlu J, Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology. 2006; 9(1): 0717-3458.

(2) Gandhi N, Applications of Lipases. JAOCS. 1997; 74(6): 621-634.

(3) Secundo F, Carrea G, Tarabiono C, Gatti-Lafranconi P, Brocca S, Lotti M, Jaeger K E, Puls M, Eggert T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic. 2006; 39(1-4): 166-170.

(4) Global Markets for Enzymes in Industrial Applications (BIO030G). BCC Research. June 2014, visited June 7th 2016. Available from: http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html

(5) Gupta R, Gupta N and Rathi P, Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007; 64(6): 763-781.

(6) Fujinami S and Fujisawa M, Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes past, present and future. Environmental Technology. 2010; 31(8-9): 845-856.

(7) Charbonneau D M, Meddeb-Mouelhi F and Beauregard M, A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: evidence for a new carboxylesterase family. The Journal of Biochemistry. 2010; 148(3): 299-308.

(8) Rahman R N Z R A, Masomian M, Salleh A B and Basri M, A new thermostable lipase by *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ: nutritional studies. Annals of Microbiology. 2009; 59(1): 133-139.

(9) Masomian M, Rahman R N Z R A, Salleh A B and Basri M, A unique thermostable and organic solvent tolerant lipase from newly isolated *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ: physical factor studies. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010; 26(9):1693-1701.

(10) Masomian M, Rahman R N Z R A, Salleh A B and Basri M, Analysis of a Comparative Sequence and genomic Data to Verify Phylogenetic Relationship and Explore a New Subfamily of Bacterial lipase. PLOS one. 2016; 11(3): e0149851.

(11) Bradford M, A dye binding assay for protein. Analytical Biochemistry. 1976; 72: 248-254.

(12) Kouker G and Jaeger K-E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. Applied and Environmental Microbiology. 1986; 53(1): 211-213.

(13) Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S and Madden T M, NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Research. 2008; 36: W5-W9.

(14) Chakravorty D, Parameswaran S, Kumar Dubey V and Patra S, In silico characterization of thermostable lipases. Extremophiles. 2011; 15(1): 89-103.

(15) Pettersen E, Goddard T, Huang C, Couch G, Greenblatt D, Meng E and Ferrin T, UCSF Chimera-A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. InterScience. 2004; 25(13): 1605-1612.

(16) Rahman R N Z R A, Leow T, Salleh A B and Basri M, *Geobacillus zalihae sp.* Novel thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. BMC Microbiology. 2007; 7(1): 77.

(17) Hooft R W W, Vriend G, Sander C and Abola E E, Errors in protein structures. Nature. 1996; 381(6580): 272.

(18) Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D and Thornton J M, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography. 1993; 26(2): 283-291.

(19) Arnold K, Bordoli L, Kopp J and Schwede T, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics 2006; 22(2):195-201.

(20) Johnson WC, Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. Proteins. 1999; 35(3): 307-312.

(21) Sreerama N and Woody RW, Estimation of protein secondary structures from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR with an expended reference set. Analytical Biochemistry. 2000; 287(2): 252-260.

(22) Charbonneau D M and Beauregard M, Role of Key Salt Bridges in Thermostability of *G. thermodenitrificans* EstGtA2: Distinctive Patterns within the New Bacterial Lipolytic Enzyme Family XV. PLOS one. 2013; 8(10): e76675.

Rapport-Gratuit.com

(23) Pace C N, Shirley B A and Thompson J A, Measuring the conformational stability of a protein. In: Creighton TE, editor. Protein structure-A practical approach. Oxford University Press; 1989; 1: 311-330.

(24) Zottig X, Meddeb-Mouelhi F and Beauregard M. Development of a high throughput liquid state assay for lipase activity using natural substrates and rhodamine B. Analytical Biochemistry. 2016; 496: 25-9.

(25) Timucin, E and Sezerman, O U. The Conserved Lid Tryptophan, W211, Potentiates Thermostability and Thermoactivity in Bacterial Thermoalkalophilic Lipases. PloS ONE 8(12): e85186. DOI: 10.1371/journal.pone.0085186

(26) Li, H. and Zhang, X. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. Protein Expression Purification. 2005; 42(1);153-9.

(27) Balan, A., Ibrahim, D., Abdul Rahim, R and Azzahra Ahmad Rashid, F. Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. Enzyme Research 2012; ID 987523, doi: http://dx.doi.org/10.1155/2012/987523

(28) Korman, T.P., Sahachartsiri, B., Charbonneau, D.M., Huang, G.L., Beauregard, M. and Bowie, J.U. Dieselzymes: development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. Biotechnology for Biofuels; 2013, 6:70-83.

(29) Arpigny J L and Jaeger K E. Bacterial lipolytic enzymes classification and properties. Biochemical Journal, 1999; 343(1); 177-183.

(30) Fisher M and Pleiss. The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for proteins families. Nucleic Acids Research. 1998; 31(1); 319-321.

(31) Brocca S, Secundo F, Ossola M, Alberghina L, Carrea G and Lotti M. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugose* lipase isoenzymes. Protein Science. 2003; 12(10); 2312-9.

(32) Xiao X and Lowe ME. The β5-Loop and Lid Domain Contribute to the Substrate Specificity of Pancreatic Lipase-related Protein 2 (PNLIPRP2). Journal of Biological Chemistry. 2015; 290(48); 28847-56. doi: 10.1074/jbc.M115.683375

(33) Yu X W, Tan N J, Xiao R and Xu Y. Engineering a disulfide bond in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase: increased thermostability and altered acyl chain length specificity. PLoS One. 2012; 7(10):e46388. doi: 10.1371/journal.pone.0046388

Table 1. Comparison of lipase motifs in lipase family I.5 representatives related to LipAT

Lipases[a]	Accession no.	Nucleophile elbow	Oxyanion hole	Lid domain	P-loop motif	Zinc binding domain	Res. Identity %	Clad
LipT1	3UMJ	AHSQG	PIVLLHGFTG	DFTDRFFDLQKAVLEAAAVASNV	GHARFGRT	GAAHAAKH	57	G
BTL	2W22	AHSQG	PIVLLHGFTG	DFTDRFFDLQKAVLEAAAVASNV	GHKRYGRT	GAAHAAKH	56	G
LipT6	4X7B	AHSQG	PIVLLHGFTG	DFTDRFFDLQKAVLKAAAVASNV	GHARFGRT	GAAHAAKY	56	G
LipBs	1KU0	AHSQG	PIVLLHGFTG	DFTDRFFDLQKAVLEAAAVASNA	GHARFGRT	GAAHAAKH	57	G
LipPf	5AHO	AHSMG	PIVLVHGFMG	NIFGDFAKNLVASLASFT	GHSRYGRT	GHAHSTQK	54	
LipAT	ADC84241	GHSMG	PIVLVHGFAG	TQLIPAAQQIMGLAAAVS	GHDRFGRT	GAAHAEKY	100	
LipBG	WP_033676810	GHSMG	PIILVHGFTG	LLLPTVKELLVAAASIG	GHDRYGRT	GAAHAEKH	63	B
LipBp	EEM16752	GHSMG	PIILVHGFTG	LLLPAVKQLLVATAGIG	GHDRYGRT	GAAHAEKH	62	B
LipBc	WP_000517067	**G**HSMG	PIIL**V**NGF**A**G	LLLPFVKDLLITAASFG	GHNRFGRT	GAVHA**E**KH	60	B
LipBt	WP_038415277	**G**HSMG	PIIL**V**NGF**A**G	LLLPFVKDLLITAASFG	GHNRFGRT	GAVHA**E**KH	60	B

[a] Source of lipases; LipT1: *G. zalihae*; BTL: *G. thermocatenulatus*; LipT6: *G. stearothermophilus*; LipBs: *G. stearothermophilus* L1; LipPf: *P. fermentans*; LipAT: *A. thermoaerophilus*; LipBG: *B. gaemonkensis*; LipBp: *B. pseudomycoides*; LipBc: *B. cereus*; LipBt: *B. thuringiensis*. G: *Geobacillus* clade from figure S5; and B: *Bacillus* clade from figure S5. Residues that are exclusive to clade B and Lip AT are shown in bold characters.

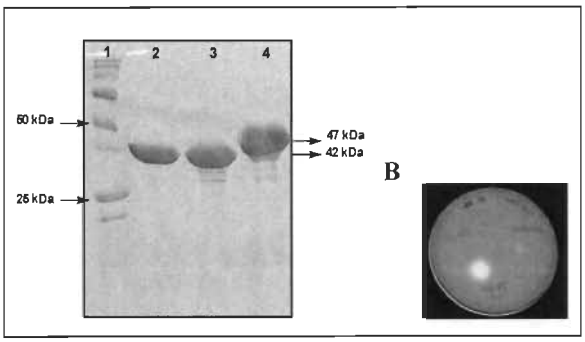


Figure 1. SDS-PAGE of recombinant LipAT and lipase activity detection on agar plate containing rhodamine-olive oil emulsion. Panel A: SDS-PAGE analysis. Lane 1: molecular weight size marker Precision plus; lane 2: 10 µg of tag cleaved and repurified LipAT (43 kDa); lane 3: 10 µg of purified and cleaved LipAT (43 kDa); lane 4: 10 µg purified His-tagged LipAT (45 kDa). **Panel B:** Lipase activity detection on rhodamine-olive oil petri dish, using 34 µg of cleaved and purified LipAT at 50°C after 1 h incubation.

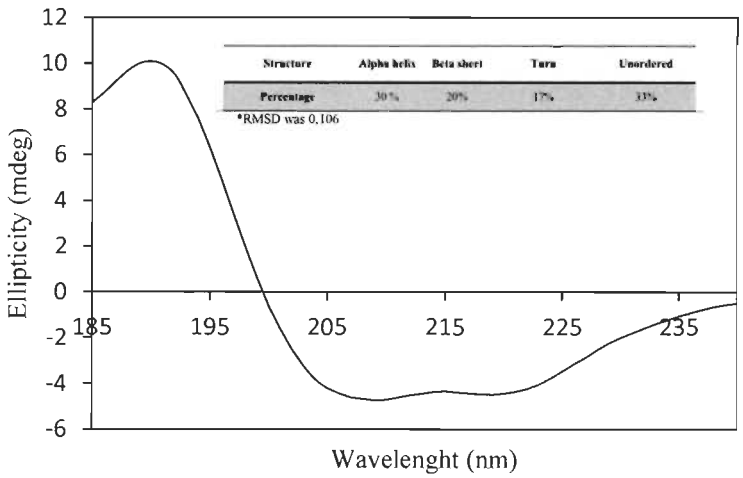


Figure 2. Conformational analysis of LipAT by far-UV circular dichroism. CD spectra were recorded in the far UV using protein at 0.5 mg/ mL in 20 mM sodium phosphate pH 8 and at room temperature. Percentages of secondary structures calculated from the spectra are shown in the figure (see Materials and Methods for details).

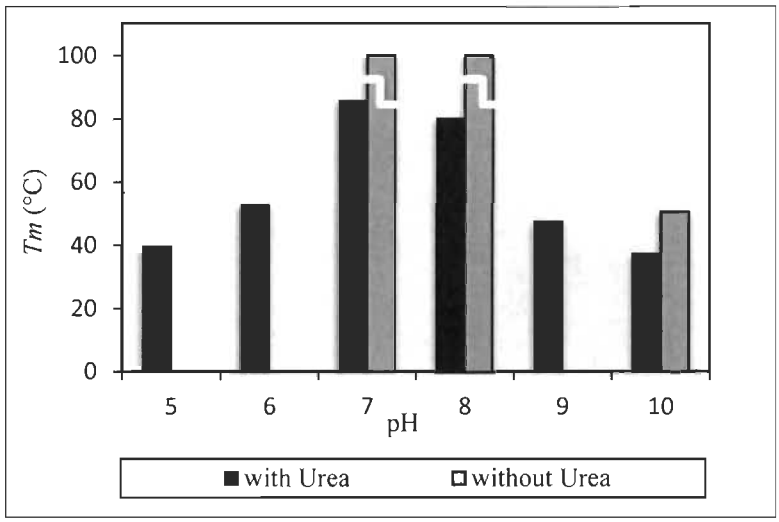


Figure 3. Denaturation of protein secondary structures in LipAT. Apparent melting temperatures derived from variable-temperature CD analysis, with and without urea, as a function of pH. Results represent the mean of three separate values calculated from the analyses of denaturation curves. Thermal melting (T_m) of LipAT was monitored by ellipticity changes at 222 nm over a temperature range of 25 to 104°C with a heating rate of 0.8°C/min in the presence (black bars) or absence of 2 M urea (grey bars). Experiments were performed in various buffers depending on the conditions tested: sodium citrate (pH 5 and 6), sodium phosphate (pH 7 and 8) and sodium bicarbonate (pH 9 and 10) Broken lines in the bars corresponding to *Tm* without urea at pH 8 and 7 indicate that the melting temperatures could not be calculated under these experimental conditions.

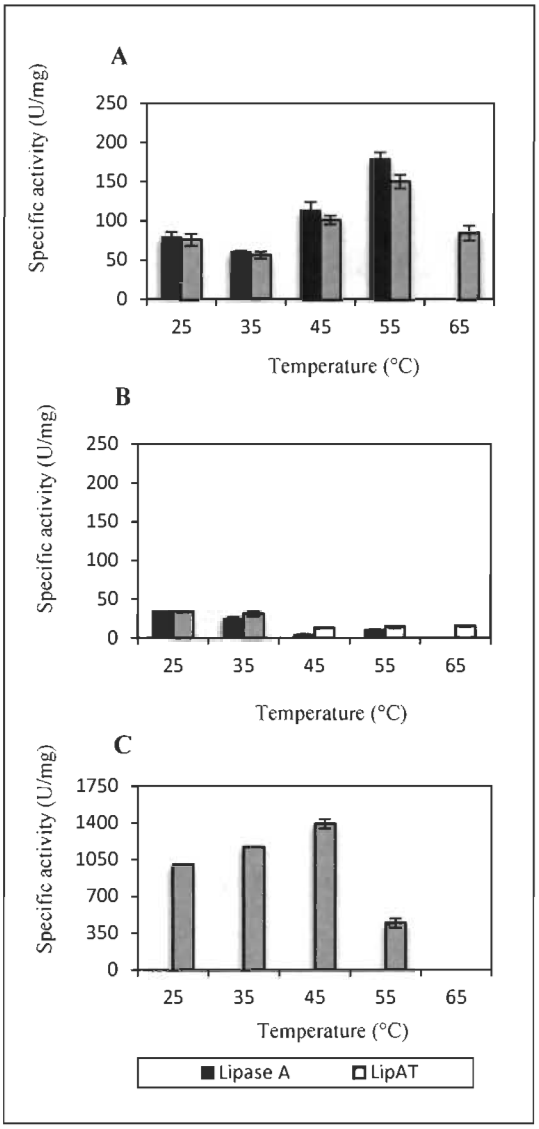


Figure 4. Lipase activity of LipAT at different pH and temperatures. Activity of LipAT was assayed with 24 μg of protein for pH 5 to 9 and 0.6 μg for pH 10 (panel C). Protein concentration was reduced due to the large increase in activity at pH 10 and was considered in the calculations for specific activity. **Panel A:** Activity at pH 7; **Panel B:** At pH 8; **Panel C:** At pH 10. Appropriate buffers were used for the preparation of rhodamine B and olive oil emulsions (RhB-OOe). Specific activity was calculated from initial rates. One unit is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 μmol of olive oil per minute under the assay conditions and is used to calculate the specific activity (U/mg). Enzyme activity of lipase samples was shown in grey bars for LipAT and with black bars for commercial lipase A. Results represent the mean of three separate values and standard error of the mean (SEM) was determined.

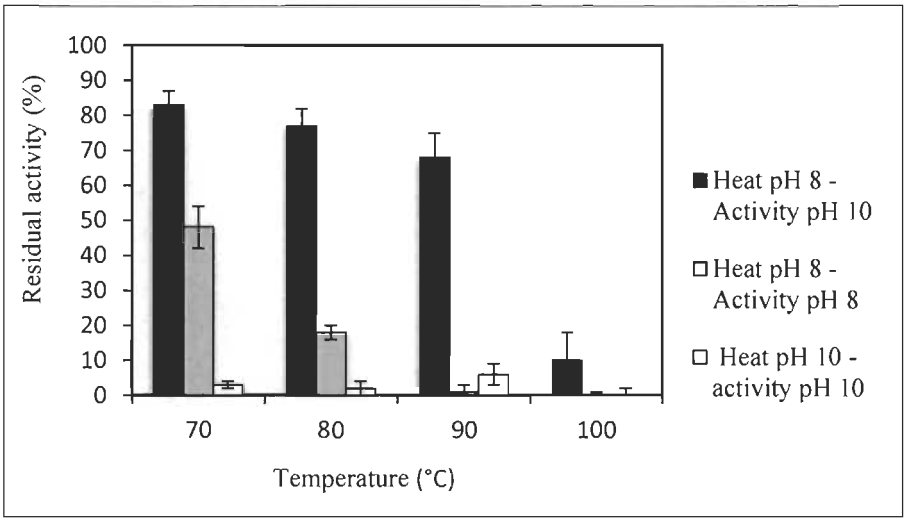


Figure 5. Residual activity of LipAT after heating. Thermal stability was determined using 24 μg of protein. Appropriate buffers were used for the RhB-OOe preparation. The protein was heated at various temperatures (70, 80, 90, 100°C) and pH (8 and 10) for 15 minutes and then cooled by incubation at room temperatures for 15 minutes prior to recording activity. Activity measured with similar samples without heating was defined as 100% relative activity. Results represent the mean of three separate values and standard error of the mean (SEM) was determined.

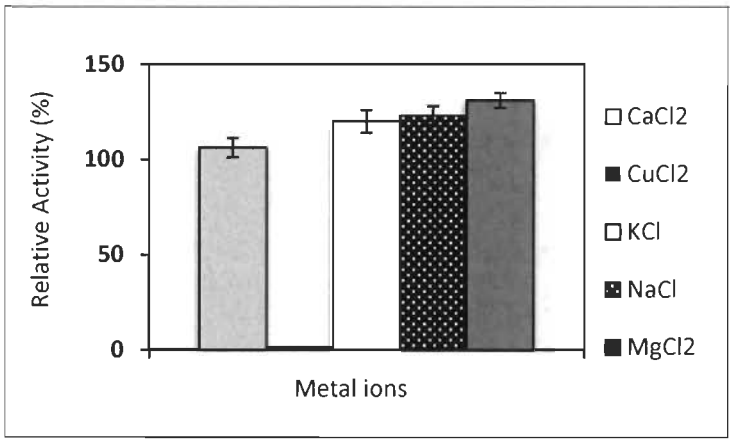


Figure 6. Effect of metal ions on LipAT activity. Metal ions impact on LipAT activity was assayed using 0.6 μg of protein under optimal activity conditions (pH 10, 45°C). The concentration of metal ions (Ca^{2+}, Cu^{2+}, K^{+}, Na^{+}, Mg^{2+}) used in the RhB-OOe emulsion was 1 mM and 5 mM. Activity without metal ions was defined as 100% relative activity. Results represent the mean of three separate values and standard error of the mean (SEM) was determined.

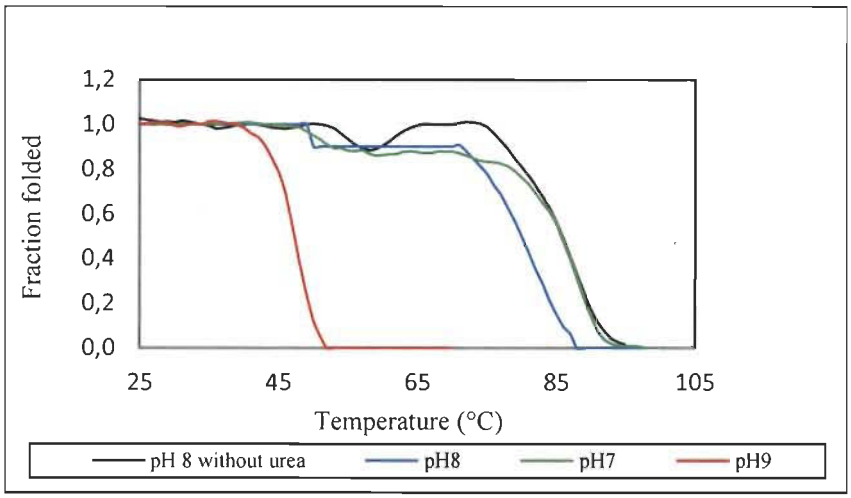


Figure S1. Thermal denaturation of LipAT as function of pH. Secondary structure of LipAT monitored at 222 nm during thermal denaturation using a protein concentration of 0,5 mg/ml in 20 mM phosphate buffer in absence of urea at pH 8 (black), in the presence of 2 M urea at pH 8 (blue), in the presence of 2 M urea at pH 7 (green), in the presence of 2 M urea at pH 9 (red) and in the presence of 2 M urea at pH.

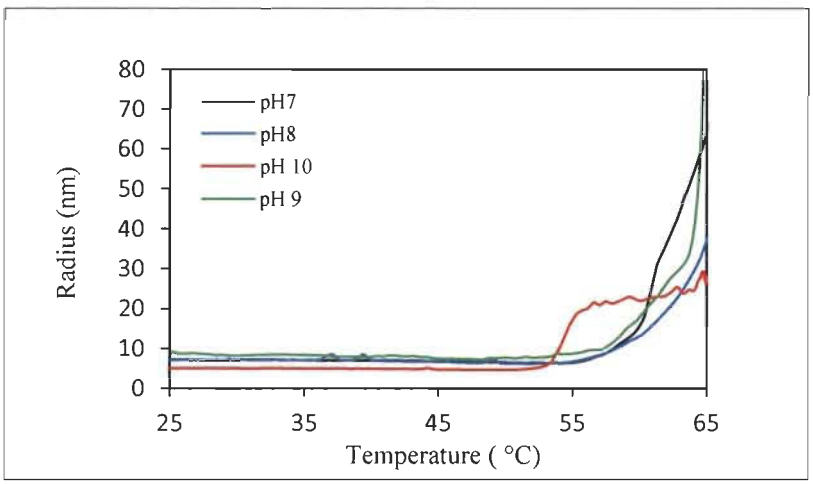


Figure S2. Thermal unfolding DLS scan of LipAT. Thermal denaturation was monitored using dynamic light scattering at different pH (phosphate and carbonate were used depending on pH) and protein concentration was 2 mg/mL. Samples have been filtered through 0.1 μm filter before measurements. The temperature range from 25 to 65°C was used. Results represent the mean of three separate experiments.

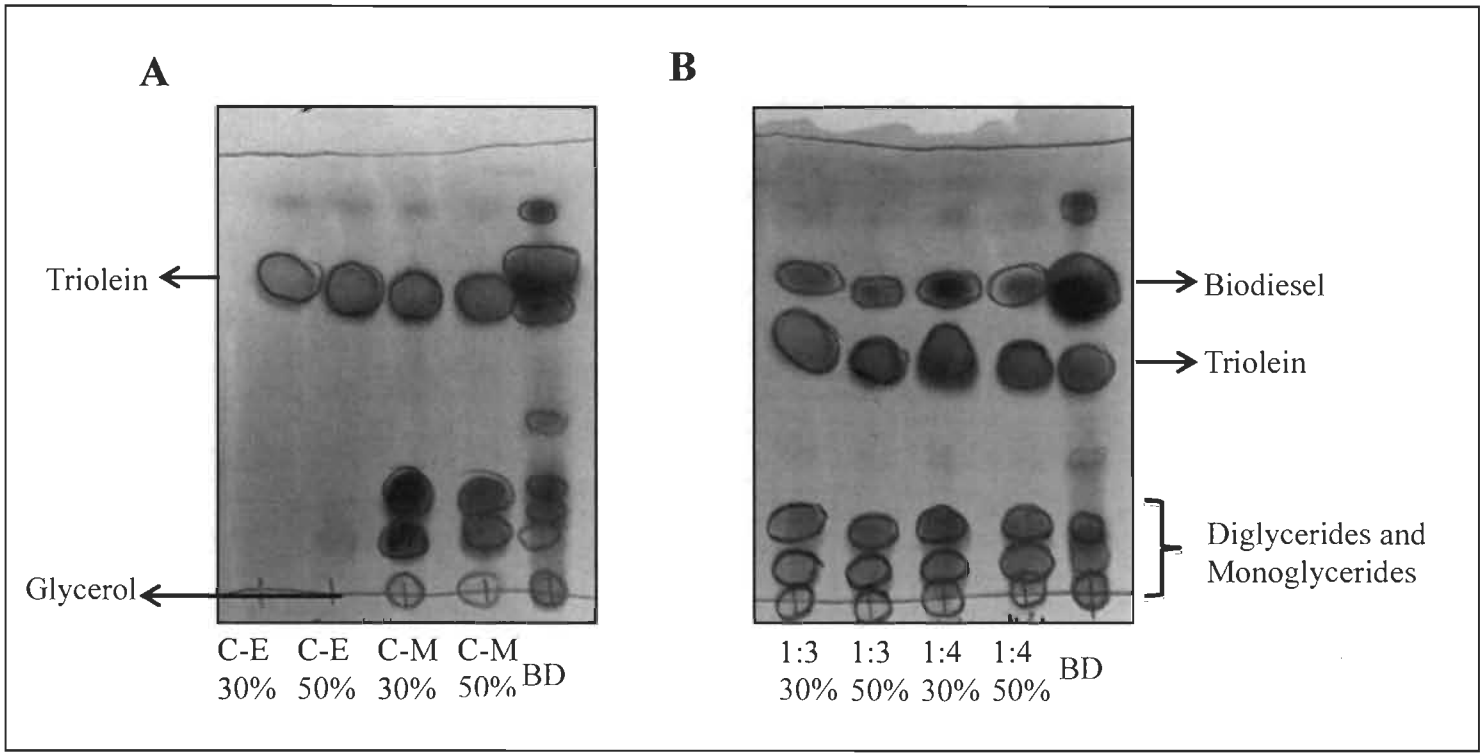


Figure S3. Biodiesel synthesis. Panel A: TLC plates after separation of the substrates and/or products relevant to biodiesel synthesis using LipAT. **C-E:** Enzyme negative control using 30 and 50% (w/ w) of water and 1:4 (triolein/methanol). **C-M:** Methanol negative control using 30 and 50% (m/m) of water. **Panel B:** TLC plates after biodiesel synthesis. Here, the molar ratios were 1:3 and 1:4 (triolein/methanol) in 30 and 50% (w/ w) (water/ triolein). **BD:** Biodiesel synthetized by alkaline method. An amount of 24 μg of protein was used, the reaction was performed over night at room temperature under agitation (200 rpm) and methanol was added only once (at the beginning of the experiment). Samples and controls were normalized in acetone. A mixture of hexane-ethylacetate (90:10 v/v) was used as the mobile phase and plate development (staining) was performed with phosphomolybdic acid (PMA).

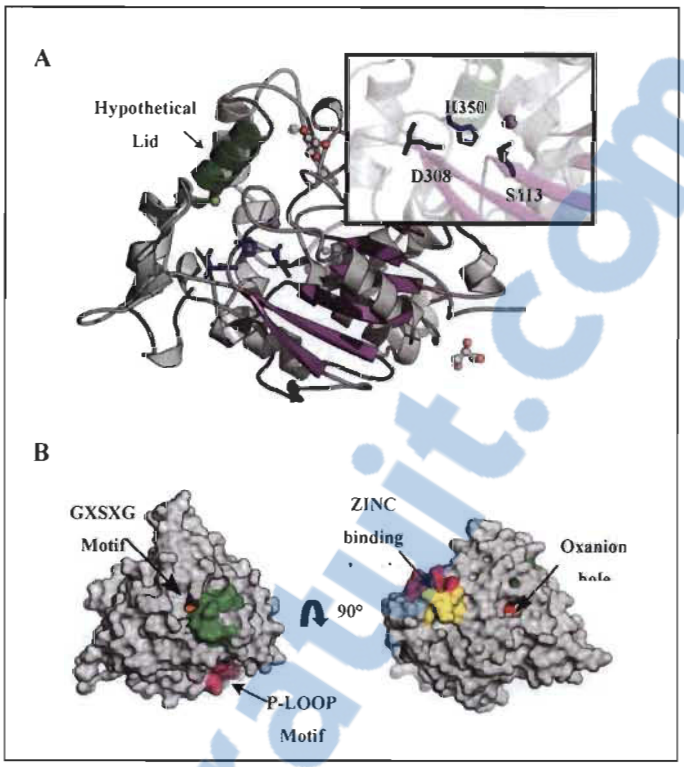


Figure S4. 3D model of LipAT, conserved domains and interactions. Panel A: Ribbon modelled structure of LipAT using the crystal elucidated structure lipase from *Geobacillus zalihae* mutant D311G (PDB. 3UMJ). Lid domain was investigated using exteriors helix and domains described by *Chakravorty et al.* 2011 and identified in the structural model constructed (14). Amino acids of the typical catalytic triad (Asp-His-Ser) of LipAT are shown in stick representation. **Panel B:** Conserved motifs domains have been identified using Chakravorty *et al.* 2011 (14) and illustrated using different colors: the GXSXG motif in orange, the lid domain (green), the P-loop domain (pink), the Zinc binding domain (yellow), the oxyanion hole (red) and the catalytic triad in deep blue.

Rapport-Gratuit.com

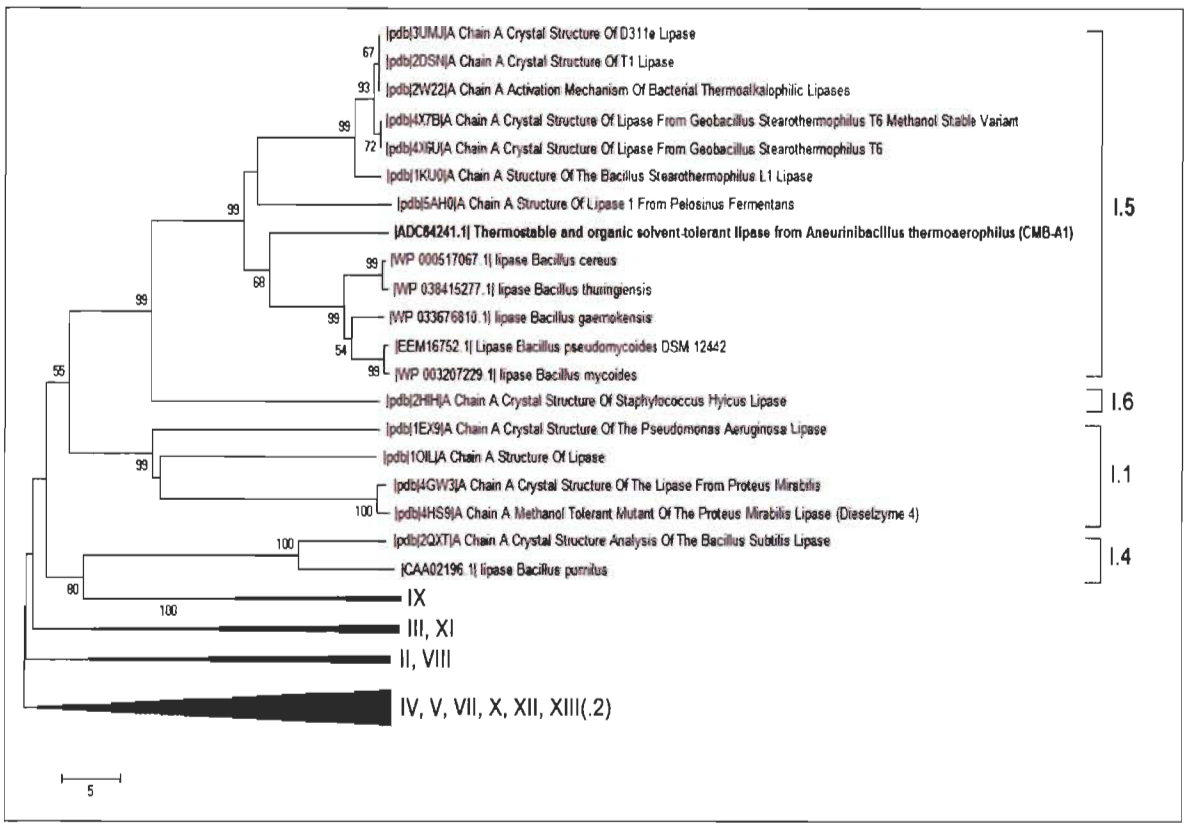


Figure S5. Phylogenetic tree of bacterial lipolytic enzymes. Phylogenetic analysis of bacterial lipolytic enzyme sequences belonging to 13 out of the 15 families reported based on the extension of the Arpigny and Jaeger's classification. The phylogenetic clusters corresponding to families II to XIII.2 were compressed for clarity. The lipase sequences belonging to family I (true lipases) are shown. The *Aneurinibacillus thermoaerophilus* lipase (LipAtC1) apprears to belong to family 1.5 as shown in bold. A total of 55 amino acid sequences were aligned with ClustalW and the evolutionary analyses were conducted in MEGA6. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method and the optimal tree with the sum of branch length is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the number of differences method and are expressed as the number of amino acid differences per sequence.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'objectif principal de ces travaux de recherche était de réaliser une caractérisation exhaustive d'une nouvelle lipase alcaline. Cette caractérisation visait de manière générale à accroitre les données en lien avec la structure et l'activité des lipases. De plus, considérant le lien structure-fonction, nous croyons qu'à long terme ces données pourraient être utilisées avec succès pour prédire ou contrôler les propriétés enzymatiques sur la base de l'ADN (annotation génomique). Ainsi, elles permettraient d'améliorer l'application de ces enzymes au niveau industriel.

4.1 Analyses *in silico*

Dans ces travaux de recherche, une investigation bioinformatique a été réalisée. Celle-ci a permis de proposer que la lipase d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* montre un repliement de type α/β hydrolase. En fait, une panoplie d'enzymes possède cette architecture particulière, mais n'affiche pas toujours de hauts niveaux de similitude en ce qui concerne la séquence ou de leur fonctionnement d'où la grande variété d'enzymes avec ce type de repliement. Cette structure tertiaire est la plus fréquente dans la nature et les lipases possèdent majoritairement ce type de structure. Considérant l'arbre phylogénétique construit dans le cadre de ces travaux, nous avons suggéré que LipAT fait partie de la sous-famille I.5 telle que décrite par Arpiny et Jaeger. La famille I est connue pour regrouper des lipases dites « vraies » (activation interfaciale). Elle est subdivisée sur la base de la masse moléculaire (entre autres) et l'origine des différentes lipases. La sous-famille I.5 contient des lipases thermo-alcalinophiles des *Staphylococcus* et aussi des lipases des *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus cereus*. Ces lipases possèdent des poids moléculaires approximatifs de 45 kDa. Selon nos travaux, LipAT ferait aussi partie de la superfamille abH15.01 décrite par Fischer et

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Pleiss dans la « Lipase Engineering Database » qui regroupe des lipases semblables aux lipases de *Staphylococcus aureus* (Fisher et Pleiss, 1998). Différents motifs conservés chez des homologues de LipAT (Chakravorty *et al.*, 2011) ont été comparés avec ceux de LipAT dans le but d'identifier des éléments importants pour les fonctions de l'enzyme). Entre autres, le motif du site actif GXSXG observé dans la famille I se traduit par GHSMG chez LipAT. Cependant, dans les homologues cristallisés, majoritairement thermophiles, le motif observé est plutôt AHSQG. Il est à remarquer que le remplacement du résidu Gly par Ala est associé à la thermostabilité puisque le résidu Ala semble favoriser la stabilité de la boucle par un empaquetage plus serrée (Chakravorty *et al.*, 2011). Également, il s'agit d'un changement de résidu polaire pour un non polaire. Une autre différence intéressante est observée au niveau de la présence d'une Met concernant le motif chez LipAT qui est remplacé généralement dans les homologues cristallisés par une Gln. Dans ce cas, il s'agit d'un changement de résidu non polaire vers un résidu polaire. La structure cristalline des homologues ayant le motif GHSMG n'a pas encore été résolue. Le motif relié au trou de l'oxyanion est très conservé entre les lipases étudiées ici. Des changements au niveau de ce motif pourraient avoir un impact considérable au niveau de l'activité, puisque ce motif permet de stabiliser l'intermédiaire suite à l'attaque nucléophile de la Ser. Le changement de la Thr pour une Ala observé chez LipAT dans le trou de l'oxyanion par rapport à ses homologues doit être aussi considéré puisqu'il s'agit d'un changement entre un résidu polaire et un non polaire. De tels changements de polarité pourraient expliquer des différences de stabilité face à diverses conditions chez LipAT. Une autre particularité de LipAT qui a été identifiée dans ces travaux est au niveau du couvercle. Déjà, les motifs des couvercles sont moyennement conservés chez les lipases, mais, de plus, LipAT montre un motif particulier et très différent de ceux identifiés préalablement pour ses homologues (par exemple, *Bacillus stearothermophilus P1).* Seule la présence de la séquence poly Ala est conservée et elle est associée à la thermostabilité. Compte tenu de l'importance du couvercle pour l'activation interfaciale et son impact sur l'activité des lipases, il semble évident qu'un intérêt particulier doit être porté sur ce motif unique chez LipAT. Il pourrait avoir un impact direct sur l'activité de LipAT. Les observations discutées ci-haut n'ont pas été révélées dans un article récent où l'emphase a plutôt été

portée sur la divergence générale de la séquence d'une enzyme qui pourrait être LipAT face aux autres lipases homologues connues (Masomian *et al.*, 2016). Les motifs en lien avec la boucle-P et le site de liaison au zinc sont assez bien conservés entre LipAT et ses homologues. Ils sont considérés comme des motifs hautement conservés chez les lipases thermoalcalines provenant des *Bacillus*. Ces motifs ont été identifiés dans le modèle qui a été construit en se basant sur un homologue cristallisé produit par *Geobacillus zalihae,* qui possède 57 % d'identité par rapport à LipAT. Ce pourcentage étant assez faible, il est très difficile de tirer des conclusions détaillées (par exemple, les rotamères choisis par l'algorithme pour optimiser le modèle ne sont pas nécessairement ceux qui existent dans la structure réelle), d'où l'importance de résoudre par cristallographie la structure de cette nouvelle lipase. Des travaux permettant de résoudre la structure cristalline de LipAT ont été entamés en collaboration avec le laboratoire du Dr Berghuis à l'Université McGill. Finalement, une très grande quantité de résidus aromatiques a été observée au niveau de LipAT et ses homologues. Ces résidus semblent être très bien conservés au niveau de la séquence des lipases en question. L'étude de l'importance des résidus aromatiques chez ces lipases pourrait permettre de résoudre certaines énigmes sur la stabilité et la spécificité.

4.2 Résolution de la structure et de la thermostabilité

Des études biophysiques ont été réalisés par dichroïsme circulaire dans l'UV éloigné ce qui a permis de déterminer la distribution des structures secondaires. Les données expérimentales obtenues correspondent au repliement α/β hydrolase, tel que suggéré préalablement à partir des analyses bioinformatiques. Ces résultats structuraux concordent avec la classification des lipases de « Lipase Engineering Database ». En fait, toutes les lipases qui se retrouvent dans cette banque de données ayant des origines multiples présentent un repliement de type α/β hydrolase. Au niveau de la structure tertiaire étudiée en UV rapprochés, l'obtention d'informations structurales a été moins fructueuse. Cette analyse avait comme but d'évaluer la motilité des chaines latérales aromatiques. L'absence de signal dans l'UV proche par dichroïsme circulaire a été notée et elle se traduit par une absence d'environnement asymétrique restreint au

niveau des chaines latérales aromatiques. Ce résultat est très particulier puisque LipAT possède un grand nombre de résidus aromatiques. Une investigation plus approfondie a été réalisée par fluorescence des protéines où les résultats indiquent une haute proportion de résidus aromatiques hydratés. Cela concorde avec les résultats obtenus au niveau du dichroïsme circulaire dans l'UV proche : la plupart des Trp seraient exposés au solvant donc peu utile comme rapporteurs de dénaturation. L'intérêt en ce qui concerne la fonction de ces résidus aromatiques bien conservés chez LipAT et ses homologues est encore une fois illustré par ces résultats. Leur fonction ou distribution à la surface pourrait être un élément clef pour l'activité ou la stabilité des lipases thermo-alcalinophiles.

Ensuite, afin d'investiguer la thermostabilité de LipAT, nous avons suivi la perte des structures secondaires lors de la dénaturation thermique en suivant le signal dichroïque à 222 nm. Pour commencer, l'expérience a été réalisée à pH 8 où il a été impossible d'observer une dénaturation complète même à 100 °C. Il est à remarquer que l'appareil utilisé pour ces expériences ne peut chauffer à une température supérieure à 104 °C. Divers artéfacts auraient pu masquer la perte des structures secondaires, c'est pourquoi cette expérience a été réalisée à nouveau à pH 7. Cette expérience avait comme but de confirmer la thermostabilité de cette enzyme dans d'autres conditions. Encore une fois, une dénaturation complète n'a pas été observée. Ce résultat est fort intéressant puisqu'il témoigne d'une thermostabilité très élevée. D'un autre côté, à pH 10, LipAT s'est avérée moins thermostable, Tm 51 °C, et une dénaturation complète a été observée. L'étude de la thermostabilité de LipAT s'avère compliquée lorsque certaines températures de fusion ne peuvent être calculées. Dans le but de mieux comprendre ce phénomène, nous avons retenté l'expérience avec l'ajout d'un dénaturant chimique, l'urée (2M), de manière à pré-déstabiliser l'enzyme. En fait, l'utilisation d'un dénaturant chimique permettrait de déstabiliser les structures secondaires et favoriser la dénaturation de l'enzyme. Dans ce contexte, la dénaturation complète devrait être observée à plus basse température. De plus, des études sur l'agrégation des peptides ont montré que l'utilisation de l'urée défavorise l'agrégation (Hamada *et al.*, 2009). L'impact de l'urée pourrait révéler la possible formation d'agrégats protégeant les

structures secondaires de la dénaturation à haute température. Avec l'ajout d'urée, la température de fusion la plus élevée qui a été observée est de 86 °C à pH 7, cette température de fusion confirme le caractère hyperthermostable de LipAT. Comparativement à la littérature, le mutant D311E de la lipase homologue provenant de *Geobacillus zalihae* montre une température de fusion de 70 °C (Ruslan *et al.*, 2013). Il faut considérer que cette température de fusion a été établie sans l'utilisation d'un dénaturant chimique, néanmoins le Tm est 16 °C plus bas que celui obtenu pour LipAT. Également, une autre lipase thermostable isolée à partir de *Bacillus sp.* L2 possède une température de fusion de 59 °C, ce qui correspond à 27 °C de moins que LipAT (Shariff *et al.*, 2011). Ici, la comparaison des diverses températures de fusion doit être interprétée avec retenue, considérant que ces Tm ont été obtenus par d'autres expérimentateurs dans d'autres conditions (par exemple, le tampon dans lequel l'expérience a eu lieu, la vitesse de chauffage utilisée et la concentration de protéine utilisée). Cependant, dans tous les cas, il est évident que LipAT est très thermostable. La technique de diffusion dynamique de la lumière a été utilisée dans le but de mieux comprendre les résultats de dénaturation thermique obtenus sans l'urée. Les résultats obtenus ont été difficiles à traiter considérant que le phénomène d'agrégation en fonction de la dénaturation thermique n'est pas tout à fait claire. Il serait nécessaire de réaliser le même type de test en présence d'urée dans le but d'essayer de comprendre la différence des phénomènes observés à pH 7, 8 et 9 versus celle observée à pH 10. Ce phénomène pourrait être très intéressant considérant que LipAT est une lipase alcalinophile avec un pH optimal à 10. Il devrait aussi être considéré qu'à pH 10 l'activité hydrolytique est complètement perdue à 65 °C et que c'est au seul pH où l'activité est complètement perdue à cette température.

4.3 Détection de l'activité hydrolytique

Une panoplie d'applications industrielles a été décrite préalablement pour les lipases. L'importance de la détection dans des conditions semblables à celles prévalentes en industrie a aussi été relevée. La technique que nous avons développée dans ces travaux permet la détection de l'activité enzymatique avec des substrats naturels à l'aide

de la rhodamine B. En fait, des substrats purs, tels que la trioléine, et d'autres moins purs, tels que l'huile d'olive, peuvent être utilisés pour la détection de l'activité lipase. Cette nouvelle technique basée sur celle développée par Jette et Ziomek (Jette et Ziomek, 1993) possède une panoplie d'avantages. D'abord, elle se fait en état liquide par la préparation d'une émulsion, ce qui augmente la flexibilité du test et permet d'éliminer les problèmes de diffusion lente de l'enzyme dans les milieux solides. Ensuite, par son état liquide, la préparation peut être manipulée par pipetteurs robotisés. Grâce à ces avantages, cette technique se prête au criblage de nouvelles lipases à haut débit, nécessaire en métagénomique. De plus, il s'agit d'une méthode simple et les solutions réactionnelles sont stables (des semaines). De plus, l'intérêt de ce test réside dans le contrôle des conditions réactionnelles difficilement compatibles avec un gel. En fait, le pH et la température peuvent être variés dans ce test de manière à établir les conditions optimales d'hydrolyse. Dans le cas du test de Jette et Ziomek, ces conditions ne peuvent être contrôlées à cause de l'état solide du test. Une augmentation de la température peut causer la liquéfaction du gel et un pH acide peut nuire à la polymérisation ou gélification.

4.4 Caractérisation enzymatique

Le test préalablement décrit a permis de déterminer l'activité de LipAT à différentes conditions de pH et température. L'enzyme s'est avérée active dans tous les pH examinés, 5 à 10, ce qui lui permet de s'adapter à plusieurs procédés. Cependant, avec un pH optimal de 10, elle serait clairement plus adaptée à des procédées en conditions alcalines. D'ailleurs, son activité spécifique très élevée qui frôle les 1400 U/mg à pH 10 et 45 °C est remarquable. Cette lipase pourrait être une excellente candidate pour améliorer les performances des détergents dont le pH est très élevé (9 et plus). Malgré que sa température optimale soit de 45 °C à pH 10, LipAT ne perd pas son activité à des températures plus élevées, tel que 65 °C. À pH 10, l'activité est perdue à 65 °C, mais sa température optimale est assez élevée pour utilisation dans des détergents domestiques (qui sont souvent formulés à pH 9 à 11).

En outre, une lipase d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* a été étudiée préalablement par Masomian *et al.* (2013). Cette lipase possède un poids moléculaire légèrement plus élevé, 50 kDa, que celui de LipAT (42 kDa). Elle a été produite à partir d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* et purifiée. Aucune analyse au niveau de la séquence d'acides aminés et/ ou ADN n'a été réalisée dans le but de vérifier que cette lipase correspondait au gène d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* cité dans les travaux précédents de Masomian *et al.* Les paramètres d'activité optimale de cette lipase correspondent au pH 7 à 65 °C. Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus dans nos travaux pour LipAT. Il est à remarquer que les conditions réactionnelles ne sont pas parfaitement identiques, mais c'est le même substrat, l'huile d'olive, qui a été utilisée par les deux équipes. La plupart des résultats qui peuvent être comparés indiquent que LipAT est différente de la lipase étudiée par Masomian *et al.*, 2013.

Récemment, ce même groupe a publié le clonage du gène NUMÉRO et l'expression d'une lipase d'*A. thermoaerophilus* (Masomian *et al.,* 2016). Dans cet article, la caractérisation de la lipase n'a pas été réalisée de façon exhaustive. Le pH optimal n'a pas été identifié, ce qui pourtant distingue LipAT de ses plus proches homologues. Cependant, l'impact de différents ions sur la protéine produite appelée LipHZ a été étudié, ce qui permet de faire une comparaison avec nos résultats correspondants. Nous avons montré que le magnésium était un activateur pour l'activité de LipAT (31 % de plus d'activité relative), mais aucun impact n'est observé sur l'activité de la lipase présentée dans les travaux de Masomian *et al.* (2016). De plus, le calcium augmente de 46 % l'activité relative de la lipase décrite par Masomian *et al.* tandis qu'il n'a aucun impact sur l'activité de LipAT. Le sodium augmente de 23 % l'activité relative de LipAT, mais diminue de 20 %, l'activité de la lipase LipHZ décrite par Masomian *et al.* Finalement, l'ion cuivre qui inhibe complètement l'activité de LipAT n'a pas eu le même effet sur la lipase décrite dans les études réalisées par Masomian *et al.* Considérant ces contradictions et considérant que Masomian *et al.* n'ont pas étudié la structure de LipHZ, ce qui permettrait de compléter la comparaison avec LipAT, il n'est pas possible de conclure que ces deux enzymes (LipAT et LipHZ) sont les mêmes.

Or dans nos travaux de recherche, le gène codant pour LipAT a été cloné dans un système d'expression recombinant. Ensuite, le gène cloné dans le plasmide a été séquencé dans le but de vérifier qu'il correspondait au gène déposé dans GeneBank par le groupe de Mosomian *et al.* (2013) auparavant sous le nom GU272057. La protéine a été produite et purifiée et son poids moléculaire apparent a été vérifié par électrophorèse SDS-PAGE. Il est donc possible de confirmer que l'enzyme LipAT qui a fait sujet de cette étude correspond au gène GU272057 codant pour la lipase ayant pour code ADC84241 (GenBank) étant constituée par 384 acides aminés. Il serait très intéressant d'analyser la séquence d'acides aminés de la lipase (ou le gène utilisé pour l'expression) étudiée par *Masomian et al.* pour vérifier l'identité de la lipase étudiée. Également, la comparaison des éléments structuraux de ces deux lipases pourrait être extrêmement intéressante et pourrait permettre de révéler certains éléments clefs au niveau de la stabilité à haute température et pH alcalin. Néanmoins, Masomian *et al.*, n'ont rien publié dans ce cadre.

Malgré que la comparaison entre l'activité de différentes enzymes demeure dépendante des détails expérimentaux propres aux études qui portent sur ces différentes enzymes, il demeure qu'une telle comparaison est nécessaire pour situer LipAT parmi les lipases, et tenter d'avancer dans la compréhension de ce qui la distingue. Dans ce contexte, on remarque que certains homologues sont plutôt thermostables, tels que la lipase provenant de *Geobacillus zalihae* qui possède une température optimale de 70 °C (Li *et al.*, 2015). Quant à elles, les lipases provenant des *Geobacillus stearothermophilus* sont actives sous une gamme allant de 35 à 80 °C. Par exemple, la lipase T6 provenant de ce microorganisme (ayant 56 % d'identité avec LipAT et étant considérée comme un homologue proche), a une température optimale de 40 °C à pH 8 (Kambourova *et al.*, 2003). Les lipases des *Staphylococcus* qui sont bien représentées dans les familles 1.5 et abH15.01 (où LipAT se trouverait) possèdent une activité optimale allant de 33 à 55 °C (Schomburg *et al.*, 2002). D'ailleurs, la lipase SAL3 de *Staphylococcus aureus* qui possède 56 % d'identité avec LipAT et partage le même GXSXG motif montre une activité optimale à 55 °C (Chakravorty *et al.*, 2011). Il existe une grande quantité d'enzymes thermophiles et malgré que dans plusieurs cas leur caractérisation ne soit pas

complète peu d'entre elles sont actives à des pH très alcalins. Ainsi, malgré que la nouvelle lipase alcalinophile d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* ne peut être considérée comme une lipase thermophile- alcalinophile, elle possède un rang d'activité très intéressant dans les pH alcalins à des températures relativement élevées. En somme, la lipase étudiée ici possède un potentiel d'application considérable, et ce, comparativement aux autres lipases préalablement discutées. De plus, sa structure particulière pourrait être clef pour l'ingénierie des lipases à vocation industrielles.

4.5 Applications industrielles

Le but de ces travaux étant aussi d'identifier le potentiel d'application de ces enzymes au niveau industriel, leur potentiel d'application doit être abordé. Dans ces travaux, la capacité de LipAT à synthétiser du biodiésel a été étudiée. Il a été montré que cette nouvelle lipase permet la tranestérification pour la synthèse de biodiésel. La problématique au niveau de la synthèse de biodiésel est le besoin d'utiliser des alcools pour la transestérification menant à la formation des esters méthyles. En fait, de manière générale, l'utilisation d'un solvant organique peut inhiber rapidement de manière partielle ou complète l'activité enzymatique tout dépendant de la concentration utilisée. De nombreuses études sont en cours dans le but de cribler des mutants ayant une forte tolérance envers des solvants organiques, tels que le méthanol, dans le but d'augmenter la productivité de la réaction. Dans l'étude réalisée par Korman *et al.*, des lipases stables et tolérantes au méthanol pour la production de biodiésel ont été développées par évolution dirigée. Dans cette étude, il a été observé que l'ajout de ponts hydrogène et de ponts salins a contribué à augmenter les propriétés en question dans certains mutants. Ils ont suggéré que les interactions polaires peuvent être particulièrement stabilisants dans un environnement diélectrique réduit (Korman *et al.*, 2013).

D'autres applications industrielles peuvent être considérées pour LipAT, par exemple le contrôle des extractibles lipidique du bois. En fait, l'industrie des pâtes et papiers fait face à différents problèmes dus aux extractibles lipidiques du bois qui

Rapport-Gratuit.com

sévissent lors de la mise en feuille de la pâte mécanique. Les conséquences de ces phénomènes incluent la diminution de la qualité du papier, l'augmentation des coûts d'entretien des machines et par conséquent d'opération. De façon à explorer le potentiel d'application de LipAT, les tests d'activité cités ici ont aussi été appliqués à l'enzyme indstirelle LipA de Buckman. Le but de cette caractérisation était de comparer l'activité de notre nouvelle lipase avec une lipase thermophile utilisée dans le pâte et papier dans les mêmes conditions de pH et température. Cette lipase LipA a été formulée chimiquement dans le but d'augmenter sa performance et elle montre une activité très semblable à celle de LipAT. Une grande différence au niveau de l'activité a, cependant, été observée au pH optimal de LipAT où la Lipase A perd toute son activité (pH 10, 45 °C). La nouvelle lipase alcaline d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* s'avère très intéressante à pH alcalin. De plus, l'utilisation de magnésium dans un tampon de formulation pourrait augmenter encore plus le potentiel de cette enzyme. LipAT serait dans ce cas une candidate très intéressante pour les détergents, pratiquement tous formulés à pH élevé.

4.6 Conclusion

Dans ce projet, la caractérisation exhaustive d'une nouvelle lipase a été réalisée. La caractérisation de la structure présentée indique que cette nouvelle lipase a un repliement de type α/β hydrolase. De plus, LipAT s'est avérée thermostable selon les tests biophysiques réalisées avec une température de fusion de 86 °C malgré une déstabilisation partielle par l'urée à 2M. Cependant, cette thermostabilité n'est pas reflétée sur l'activité hydrolytique, car la température optimale pour LipAT est de 45 °C à pH 10. L'étude *in silico* de la séquence de LipAT et la comparaison avec des séquences de lipases homologues révèlent un nombre de particularités chez LipAT. Bien que LipAT soit probablement associée aux familles I.5, telles que décrites par *Arpiny* et *Jaeger,* et abH15.01, tel que décrit dans la banque « Lipase engineering database », certains éléments sont distinctifs. Des éléments structuraux différents ont été mis en évidence telle que le couvercle. Certains motifs comme le GXSXG eux se sont montrés mieux conservés. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de certains résidus non

conservés faisant partie du couvercle sur l'activité hydrolytique. Aussi, l'importance de l'exposition du grand nombre de résidus aromatiques hautement conservés dans LipAT et ses homologues mérite qu'on s'y attarde dans des travaux futurs. Les tests d'activité hydrolytique ont été réalisés avec l'huile d'olive, un substrat naturel de l'enzyme. Dans ce cadre, un nouveau test de détection de l'activité lipase utilisant le substrat naturel et la rhodamine B comme indicateur a été développé dans ces travaux. Ce test s'adapte à des conditions de haut débit, et de pH et températures contrôlées permettant de cibler le pH et la température optimale. Ainsi, il serait adéquat pour cribler de nouvelles enzymes. Finalement, des applications industrielles pour LipAT ont été étudiées ou discutées. Cette enzyme permet la synthèse de biodiésel et est une candidate potentielle pour augmenter le pouvoir nettoyant de détergents à pH élevé.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Arpigny J L et Jaeger K E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes classification and properties. Biochem J 343; 177-183.

(2) BCC Research, (2012) Global Markets for Enzymes in Industrial Applications (BIO030G), [En ligne]. http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-industrial-enzymes-surpass-$6-billion-2016 (Page consultée le 4 janvier 2016)

(3) Berg J, Tymoczko J. (2013) Biochimie (7e éd). Paris, France. Lavoisier. p. 53-59.

(4) Brunzell J D, (2014) Familial lipoprotein lipase deficiency, GeneReviews [En ligne]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/ (Page consultée le 4 janvier 2016)

(5) Campbell M. (1999) Biochemistry (3e éd). Florida, États-Unis de l'Amérique. Harcourt Brace & Company. p. 103-131 et 143-161.

(6) Carissimi M, Ottonelli Stopiglia C D, Furtado de Souza1 T, Corbellini V A, Scroferneker M L. (2007) Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-Rhodamine B and tween 80. Tecno-logica 11; 33-36.

(7) Cesarini S, Pastor J, Nielsen P M et Diaz P. (2015) Moving towards a competitive fully enzymatic biodiesel process. Sustainability 7; 7884-7903.

(8) Chakravorty D, Parameswaran S, Dubey S K, Patra S. (2011) In silico characterization of thermostable lipases. Extremophiles 15; 89-103.

(9) Fisher M et Pleiss. (1998) The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for proteins families. Nucleic Acids Research 31; 319- 321.

(10) Gandhi N. (1997) Applications of Lipases. JAOCS 74: 6.

(11) Garrett R, Ghrisham C. (2000) Biochimie (2e éd). Paris, France. De Boeck. p. 59-206 et 427-433.

(12) Gao B, Su E, Lin J, Jiang Z, Ma Y et Wei D. (2008) Development of recombinant Escherichia coli whole- cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase- coding gene from Proteus sp. For biodiesel production. Jounal of Biotechnology 139; 169-175.

(13) Gupta R, Rathi P, Gupta N and Bradoo S. (2003) Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnology Applied Biochemistry 37; 63-71.

(14) Hamada H, Arakawa T, Shiraki K, Additives on Protein Aggregation, Current Pharmaceutical biotechnology. 2009, 10(1): 400-407.

(15) Hartl F U et Hayer-Hartl M. (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. Nature structural & molecular biology 16; 574-581.

(16) Jette J F and Ziomek E. (1993) Determination of lipase activity by a Rhodamine-Triglyceride-Agarose Assay. Analytical Biochemistry 219; 256-260.

(17) Kambourova M, Kirilova N, Mandeva, R. et Derekova A. (2003) Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic Bacillus stearothermophilus MC7. Journal of Molecular Catalisis B 22; 307-313.

(18) Kirk O l, Borchert T V et Fuglsang C C. (2002) Industrial enzymes applications. Current opinion in biotechnology. 13; 345-351.

(19) Korman T P, Sahachartsiri B, Charbonneau D, Huang G L, Beauregard M et Bowie J U. (2013) Dieselzymes: development of stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. Biotechnology for Biofuel 6; 70.

(20) Kouker G and Jaeger K E. (1987) Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. Applied and Environmental Microbiology 53; 211-213.

(21) Kuranobu N, Murakami J, Okamoto K, Nishimura R, Murayama K, Takamura A, Umeda T, Eto Y et Kanzaki S. (2015) Cholesterol ester storage disease with a novel LIPA mutation (L264P) that presented massive hepatomegaly: A case report. Hepatology reserch. Hepatol Res. Hepr.12574; Case report.

(22) Klumpp M et Baumeister W. (1998) The thermosome: archetype of group II chaperonins. FEBS letters 430; 73-77.

(23) Leemhuis H, Kelly R M and Dijkhuizen L. (2009) Directed Evolution of Enzymes: Library Screening Strategies. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life 6; 222-228.

(24) Li Y, Du W, Dai L, Liu D. (2015) Kinetic study on free lipase NS81006-catalyzed biodiesel production from soybean oil. Journal of Molecular catalysis B : Enzymatic 121; 22-27.

(25) López-López O, Cerdán M E et González-Siso M I. (2015) Thermus thermophilus as source of Thermostable Lipolitic Enzymes. Microorganisms 3: 792-808.

(26) Masomian M, Rahman R N Z R A, Salleh A B et Basri M. (2013) A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. Process Biochemistry 48; 169-175.

(27) Masomian M, Rahman R N Z R A, Salleh A B and Basri M, Analysis of a Comparative Sequence and genomic Data to Verify Phylogenetic Relationship and Explore a New Subfamily of Bacterial lipase. PLOS one. 2016; 11(3).

(28) Nardini M (1999). The X-ray Structure of Epoxide Hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. The Journal of Biological Chemistry 274; 14579-14586.

(29) Nardini M et Dijkstra B W. (1999) Alpla/beta hydrolase fold enzymes: The family keeps growing. Current opinion in structural biology 9; 732-737.Nicholls A, Sharp K A et Honig B. (1991) Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. Proteins: Structure, Fonction and Bioinformatics 11; 281-296.

(30) Ollis D L, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken S M, Harel M, Remington S J, Silman I, Schrag J, *et al.* (1992) The α/β hydrolase fold. Protein Eng. 5: 197-211.

(31) Ruslan R, Raja N Z, Raja A R, Chor L T, Mohd Shukuri M A, Basri M et Bakar S A. (2013) Improvement of Thermal Stability via Outer-Loop Ion Pair Interaction of Mutated T1 Lipase from Geobacillus zalihae strain T1. International Journal of Molecular Science 13; 943- 960.

(32) Schomburg, I, Chang, A et Schomburg D. (2002) BRENDA, enzyme date and methabolic information. Nucleic Acids Res. 30; 47-9.

(33) Secundo F, Carrea G, Tarabiono C, Gatti-Lafranconi P, Brocca S, Lotti M, Jaeger K E, l Puls M, Eggert T. (2006) The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic. 39: 166-170.

(34) Shah S, Sharma S et Gupta M N. (2003) Enzymatic transesterification for biodiesel production. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics 40; 392-399.

(35) Shariff F M, Raja N Z, Raja A R, Basri M et Bakar S A. (2011) A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. International Journal of Molecular Science 12; 2917-2934.

(36) Verger R. (1997) 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. Trends in Biotechnology 15: 32-38.

(37) Zottig X, Meddeb-Mouelhi F et Beauregard M. (2015) Development of a high throughput liquid state assay for lipase activity using natural substrates and rhodamine B. Analytical biochemistry. Analytical biochemistry 496; 9-25.

(38) Zottig X, Meddeb-Mouelhi F et Beauregard M. (2015) Expression, production et purification d'une nouvelle lipase pour le contrôle des extractibles lipidiques du bois. Centre de recherche sur les matériaux renouvelables. Note de recherche 2; 9.

(39) Zwanzig R, Szabo A et Bagchi B. (1992) Levinthal's paradox. Biophysics 89; 20-22.

ANNEXE

NOTE DE RECHERCHE

Zottig X, Meddeb-Mouelhi F et Beauregard M. (2015) Expression, production et purification d'une nouvelle lipase pour le contrôle des extractibles lipidiques du bois. Centre de recherche sur les matériaux renouvelables. Note de recherche 2; 9.

CENTRE DE RECHERCHE SUR LES MATÉRIAUX RENOUVELABLES

Fonds de recherche Nature et technologies Québec

NOTE DE RECHERCHE

SEPTEMBRE 2015 • V.2, N°9.

EXPRESSION, PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE NOUVELLE LIPASE POUR LE CONTRÔLE DES EXTRACTIBLES LIPIDIQUES DU BOIS

Résumé : La formation de dépôts d'extractibles lipidiques du bois sur le papier et sur les composantes mécaniques des machines à papier est une problématique récurrente dans l'industrie des pâtes et papier. Celle-ci représente une des causes de la diminution de la qualité du papier et de la productivité lors de la mise en feuille de la pâte mécanique. Elle conduit aussi à l'augmentation de la fréquence d'entretien des machines et des coûts opérationnels. L'utilisation de traitement enzymatique est une alternative potentielle pour le contrôle de cette problématique (exemple : l'Optimyze de Buckman). Cependant, l'enzyme idéale doit être adaptée aux conditions de haute température des procédés visés. Dans cette étude, nous avons cloné, produit et purifié une nouvelle lipase, nommée LipAT, d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus*. Cette enzyme a montré une capacité à hydrolyser les triglycérides à courte et à longue chaine d'acide gras, et ceci, à haute température.

Applications potentielles et retombées industrielles : L'utilisation de traitements enzymatiques par des lipases est une alternative intéressante pour le contrôle des extractibles lipidiques du bois parce qu'elle implique une méthode écologique à moindre coût. La lipase (LipAT) étudiée ici présente des avantages qui pourraient permettre de rendre plus efficace cette méthode de contrôle des extractibles.

INTRODUCTION

L'industrie des pâtes et papiers doit parfois faire face à différents problèmes liés aux extractibles lipidiques du bois, aussi connus sous le nom de «pitch», lors de la mise en feuille de la pâte mécanique. Ces extractibles sont composés en forte proportion de triglycérides. Ils forment des particules colloïdales qui s'agglomèrent et qui sont à l'origine des dépôts sur le papier et sur certaines composantes mécaniques. Les conséquences de ces phénomènes incluent la diminution de la qualité du papier, et l'augmentation des coûts d'entretien des machines. Habituellement, les polycations tel le poly-DADMAC sont utilisés pour contrôler les extractibles, mais ils sont issus de synthèse de produits pétroliers et ne se dégradent pas facilement. Des solutions enzymatiques ont également été envisagées pour traiter ce type de problématique, car en principe elles permettraient de contrôler les extractibles de manière écologique et à moindre coût. Un exemple est le traitement enzymatique commercialisé par Buckman appelé «*Optimyze*». Cependant, les enzymes mises de l'avant ne sont pas parfaitement adaptées aux conditions rigoureuses des procédés en question et, en conséquence, elles ne sont pas optimales. En fait, les lipases sont des enzymes très efficaces pour l'hydrolyse des triglycérides (Figure 1), mais elles peuvent perdre leur activité lorsqu'elles sont exposées à des hautes températures.

Dans le but de contrôler les extractibles de manière efficace, il est nécessaire d'utiliser des enzymes capables de supporter les températures associées aux différents procédés industriels visés. Dans cette note, nous allons décrire le clonage, l'expression, la production, ainsi que la purification d'une nouvelle lipase provenant d'une souche *d'Aneurinibacillus thermoaerophilus*. Nous avons vérifié son activité enzymatique à haute température. Cette lipase représente une candidate potentielle pour le contrôle du «pitch».

Figure 1. Réaction enzymatique d'hydrolyse des triglycérides par la lipase

I. MÉTHODOLOGIE

Criblage et identification de la souche bactérienne

Une souche d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* thermophile a été isolée à partir de compost de fumier de mouton. Cette souche a montré une activité lipase à 50 °C sur gélose contenant de l'huile d'olive[1].

Clonage et production de la lipase (LipAT)

Le fragment contenant le gène codant pour la lipase d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* (LipAT) a été amplifié par PCR. Le produit purifié de PCR a été digéré par les enzymes de restriction *Eag*I et *Bam*HI et lié au vecteur d'expression pET-30a(+) préalablement digéré par les mêmes enzymes de restrictions. Des cellules compétentes BL21 pLysS ont été transformées avec le vecteur recombinant (pET-30a+-LipAT) et sélectionnées sur gélose LB-agar contenant 50 µg/ml de kanamycine (kan). La production de l'enzyme a été optimisée.

Purification de la protéine recombinante LipAT

Suite à l'expression, la culture bactérienne a été centrifugée à 4000 révolutions par minute (rpm) afin de récupérer les cellules. Ces cellules contenant la protéine LipAT ont été lysées par choc osmotique à l'aide d'une solution hypotonique (1mM phénylméthylsulfonyle en présence de 2mM d'imidazole). Six cycles de sonication de 60 sec à 200 W ont été appliqués à la solution cellulaire à fin de compléter la lyse cellulaire. Le surnageant contenant les protéines a été récupéré par centrifugation à 10000 g pendant 30 minutes à 4°C. La

protéine a été purifiée à l'aide d'une chromatographie d'affinité avec une colonne d'affinité Ni-NTA™ (Qiagen®) et élué avec 150 mM. d'imidazole. Les fractions purifiées ont été concentrées à l'aide d'un Amicon® (Millipore) et analysées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (Figure 2). La quantification de la protéine purifiée a été effectuée par la méthode Bradford.

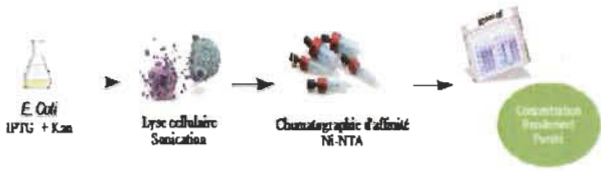


Figure 2. Schématisation des étapes de la production et purification de LipAT.

Détection de l'activité lipase à haute température

La détection de l'activité lipase à haute température a été réalisée sur géloses contenant les substrats glycéryltributyrate (C4) 1% (v/v) et huile d'olive (C16-C18) 1% (v/v) avec la rhodamine B. Les géloses ont été incubées à 50°C pendant 12 h. Environ 20 µg de protéine purifiée ont été utilisés pour chaque condition. Un contrôle négatif contenant du tampon phosphate 20 mM pH 8 sans enzyme a été utilisé. De plus, pour la gélose glycéryltributyrate, un contrôle positif contenant une carboxylesterase thermostable provenant de *Geobacillus thermodenitrificans (EstGTA2)*[2] a été utilisé.

II. Résultats et Discussion

Clonage et production de la lipase LipAT

Le séquençage et l'analyse par bio-informatique (alignement avec le gène putatif de LipAT) du gène cloné de LipAt ont permis de montrer que le gène cloné est dans le bon cadre de lecture. La culture dans le milieu liquide TB et l'induction à 0,5 mM d'IPTG pendant 5h à 25°C ont été les conditions optimales permettant d'obtenir le meilleur rendement de production de la LipAT.

Purification de LipAT

Le poids moléculaire apparent obtenu à partir de l'analyse par électrophorèse SDS-PAGE est d'environ 47 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire attendu pour la LipAT. Au final, un rendement de 34 mg de protéine pure par litre de culture a été obtenu. Ce rendement est amplement suffisant pour réaliser les différents tests d'activité enzymatique. Une très faible quantité d'enzyme, dans l'ordre du ng, est suffisante pour hydrolyser des triglycérides.

Détection de l'activité enzymatique à haute température

Des tests de détection d'activité de la protéine purifiée ont été réalisés à haute température sur boite de pétri contenant des triglycérides à longue (C16-C18) et courte chaine (C4). Ces tests ont permis de mesurer la capacité de l'enzyme LipAT à hydrolyser des lipides à haute température, donc son potentiel pour le traitement des extractibles lipidique du bois. L'activité enzymatique sur boite de pétri contenant le substrat se traduit par la présence d'un halo. Nous avons observé une forte activité lipase avec LipAT en utilisant les substrats à courte et longue chaine après 12 h d'incubation. En effet, un halo transparent large par rapport à celui de l'enzyme EstGtA2 a été observé sur les géloses contenant le glycéryltributyrate et également un halo fluorescent sur les géloses contenant l'huile d'olive lorsqu'excité par une lumière UV à 350 nm (Figure 3). Il faut noter qu'aucune activité n'a été détectée pour le contrôle négatif. Le test effectué avec la carboxylesterase thermostable EstGtA2 (contrôle positif) produit un halo sur gélose contenant le glycéryltributyrate comme substrat à courte chaine. Comme attendu pour l'enzyme EstGtA2, aucune activité n'a été observée avec ceux à longue chaine. Considérant les résultats obtenus l'enzyme LipAT est une candidate potentielle pour le traitement du pitch vu sa capacité à hydrolyser des lipides à haute température.

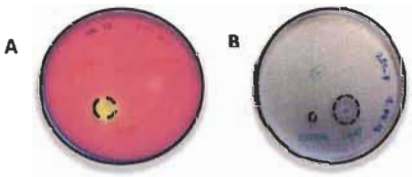


Figure 3. Détection de l'activité enzymatique de LipAT à 50°C. **A)** Huile d'olive. **B)** Glycéryltributyrate.

III. Conclusions

- Une nouvelle lipase a été clonée, produite et purifiée avec un rendement d'environ 34 mg/L de culture. Cette lipase possède une forte activité à haute température (50°C) pour les triglycérides à courte et longue chaine.
- Les résultats préliminaires de la caractérisation de la LipAT indiquent qu'elle est une candidate potentielle pour le traitement efficace et écologique des extractibles lipidiques du bois dans la production des pâtes et papiers. Son utilisation permettra de contrôler les matières gommantes, afin de réduire les casses et ainsi augmenter la production.

---

[1] Charbonneau, D.M., Meddeb-Mouelhi, F. Boissinot. M., Sirois M., Beauregard, M. 2012. Identification of thermophilic bacterial strains producing thermotolerant hydrolytic enzymes from manure compost. Indian J Microbiol 52:41-7

[2] Charbonneau, D.M., Meddeb-Mouelhi, F., Beauregard, M. 2010. A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: evidence for a new carboxylesterase family. The Journal of Biochemistry 148: 299-308.

Auteurs: Ximena Zottig, Fatma Meddeb-Mouelhi et Marc Beauregard

Pour plus d'informations: **Marc Beauregard**, professeur titulaire

Marc.Beauregard@uqtr.ca

Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques, Université du Québec à Trois-Rivières

3351 Boul. Des Forges, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

PROTEO, Université Laval, 2705 Boul. Laurier, Québec (Québec), Canada G1V 4G2

www.materiauxrenouvelables.ca