

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

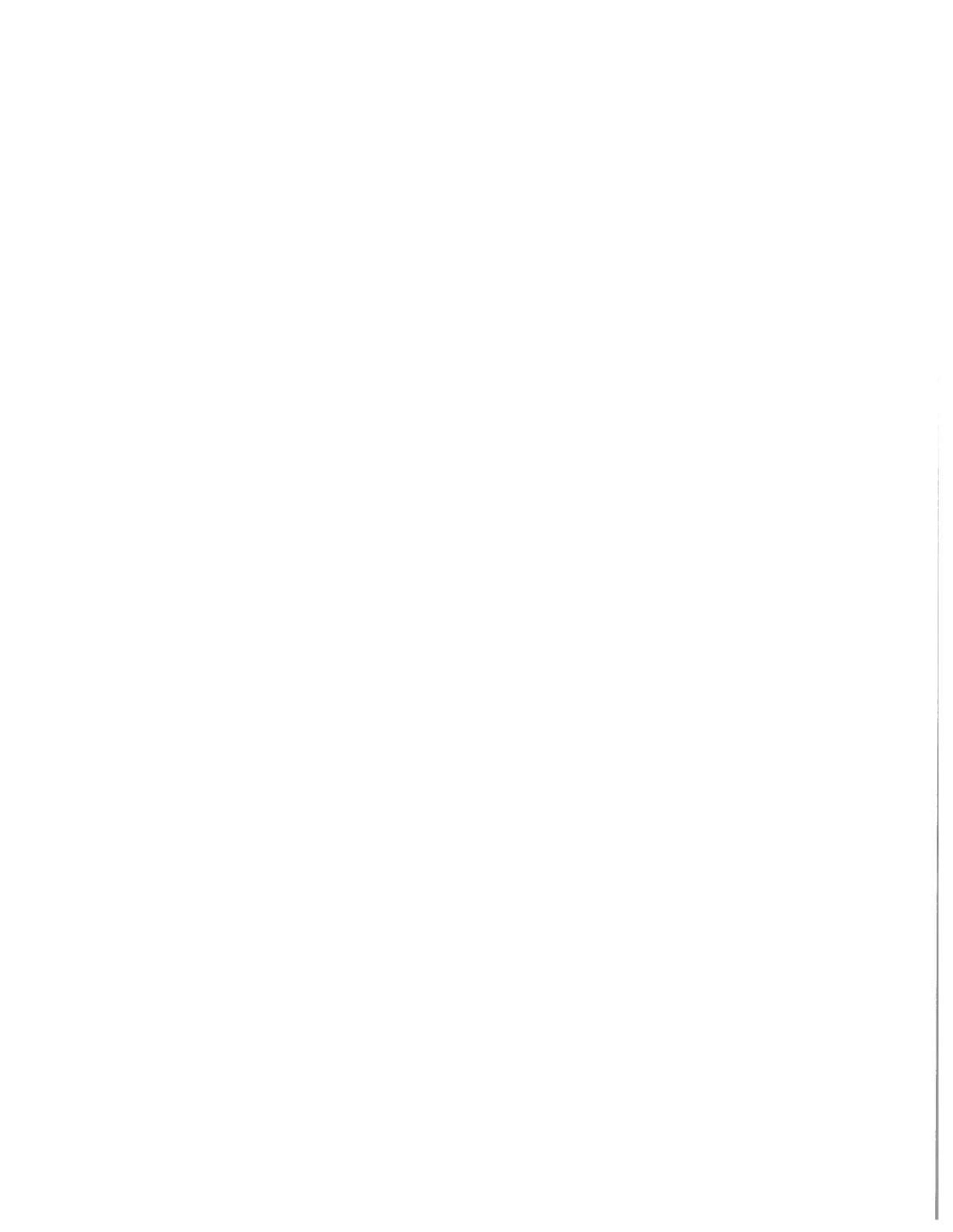
**APPROCHE ENZYMATIQUE POUR LA SYNTHÈSE D'ESTERS
CARBOXYLIQUES EMPLOYÉS INDUSTRIELLEMENT COMME ARÔMES ET
FRAGRANCES**

Par
Guillaume Brault

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

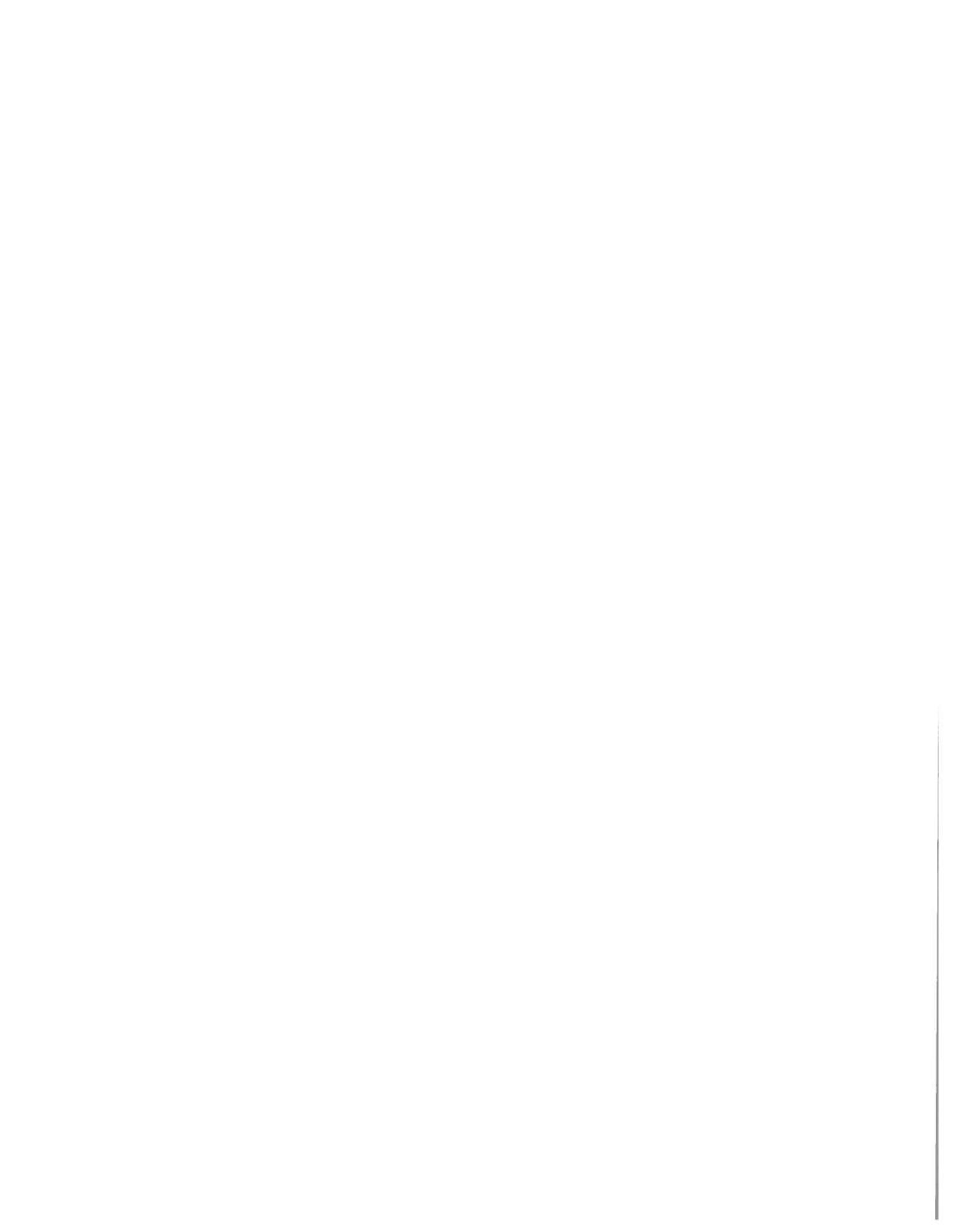
Président du jury et examineur interne	François Lépine (Ph.D.) INRS-Institut Armand- Frappier
Examineur externe	Simon Barnabé (Ph.D.) Université du Québec à Trois-Rivières
Examineur externe	Carlos Miguez (Ph.D.) Conseil National de Recherche du Canada
Directeur de recherche	François Shareck (Ph.D.) INRS-Institut Armand-Frappier
Co-directeur de recherche	Nicolas Doucet (Ph.D.) INRS-Institut Armand-Frappier



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, François Shareck, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir accordé toute la liberté et les moyens techniques nécessaires à la réalisation d'un tel projet de recherche. Il est assez rare d'avoir autant d'autonomie et de confiance de son directeur dans ce type de projet et je suis reconnaissant d'avoir pu profiter des deux. Je tiens aussi à remercier sincèrement mon co-directeur, Nicolas Doucet, qui m'a fait redécouvrir la science et m'a transmis sa passion pour la recherche. Je le remercie pour les nombreuses discussions qui ont été nécessaires à l'accomplissement de ce projet ainsi que pour son implication à chacune des étapes importantes, surtout pour avoir su tenir tête à ma tendance perfectionniste à outrance. Je remercie aussi Yves Hurtubise pour m'avoir aidé, guidé, épaulé et même défendu parfois ainsi que pour m'avoir enseigné les rudiments de la science appliquée.

J'aimerais aussi remercier tous les gens que j'ai côtoyés au quotidien et qui m'ont énormément aidé par leurs connaissances, leur professionnalisme ou tout simplement par leur gentillesse. Je tiens à remercier François Lépine pour son aide sur de multiples aspects de mon projet, Sylvain Milot ainsi qu'Anastasia Nikolakakis pour leur gentillesse et les nombreux services rendus. Je tiens aussi à remercier les anciens membres du laboratoire, Raymonde Jetté et Julie Payet pour leur infinie patience et leur immense générosité. Sans vous, rien de tout cela n'aurait pu être possible. Je tiens aussi à remercier mes bons amis Jean-Philippe Chenel et Étienne Dubé pour m'avoir épaulé et dépanné, je vous dois une bière mes amis. Enfin, je tiens à remercier les membres de ma famille, particulièrement ma mère, qui a toujours cru en moi et m'a toujours soutenu au travers de cette odyssée qu'est le doctorat. Merci aussi à mon père qui a été présent dans les moments difficiles pour m'encourager et me dépanner dans certains aspects de ma vie personnelle. C'est grâce à ce support de toutes ces personnes que je peux aujourd'hui terminer cette étape de ma vie avec fierté.



Résumé

Les esters carboxyliques de faible poids moléculaire sont des molécules volatiles aux propriétés aromatisantes rappelant les fruits et les fleurs. Leur utilisation industrielle est très importante au niveau des produits alimentaires, pharmaceutiques et des produits cosmétiques. Ces arômes et fragrances peuvent être extraits à grand frais de biomasses naturelles ou peuvent être synthétisés chimiquement selon des procédés industriels polluants. La demande croissante du public pour des produits certifiés biologiques et écologiques incite les compagnies productrices de ces esters à trouver des voies alternatives de synthèse. L'application de la biocatalyse selon un cadre de chimie verte permet de répondre à cette demande. Les enzymes lipolytiques (lipases et estérases) sont des biocatalyseurs robustes capables de synthétiser ces molécules selon les conditions exigeantes des procédés industriels. Néanmoins, les coûts de production de ces enzymes et leur efficacité moindre comparativement aux catalyseurs chimiques ne permettent pas encore d'envisager leur utilisation compétitive à grande échelle.

Afin de répondre à cette problématique, une banque d'enzymes lipolytiques a été construite à partir des informations provenant d'une librairie métagénomique criblée chez *Escherichia coli* dont l'analyse a été effectuée antérieurement à la présente étude. Cette banque a aussi été bonifiée avec l'ajout de séquences correspondant à des gènes lipolytiques présumés provenant du criblage génomique de l'actinomycète *Streptomyces coelicolor*. L'analyse de ces séquences supplémentaires a permis d'identifier une nouvelle estérase aux propriétés psychrophiles intéressantes. De plus, une lipase provenant de l'étude métagénomique a été exprimée chez l'hôte hétérologue *E. coli* afin d'être produite sous forme intracellulaire. Ce type d'expression a rendu possible le développement d'un biocatalyseur en cellules entières pour la synthèse efficace d'esters carboxyliques reconnus comme étant des arômes importants. Un montage en mini-réacteur a été employé pour synthétiser à haut rendement l'un des ingrédients principaux des saveurs de banane et de poire, l'acétate d'isoamyle. La simplicité et l'efficacité de ce type de biocatalyseur permettent d'envisager son utilisation à grande échelle pour la production d'autres arômes d'importance industrielle. Des travaux d'optimisation des enzymes par génie génétique et le développement de techniques de

cultures à grande échelle devront toutefois être menés avant de pouvoir évaluer complètement la compétitivité de l'utilisation de ce biocatalyseur selon un contexte de production industrielle.

Abstract

Short-chain carboxylic esters are important flavours and aromas reminiscent of fruits and flowers. They are widely used industrially in the food, pharmaceutical and cosmetic domains. These esters can be extracted from natural sources at great expenses or can be synthesized chemically using industrial processes with high environmental impacts. However, there is a growing demand for the usage of "natural" molecules issued from more eco-friendly processes. The utilization of biocatalysts (enzymes) in a green chemistry context can answer this problematic. Lipases and esterases are robust enzymes that are able to synthesize these molecules in the harsh conditions associated with industrial production. Nevertheless, the actual production cost of these enzymes and their inherent lower activity compared to the traditional chemical catalysts need to be improved in order to be employed at large scales.

In order to answer these limitations, a bank of lipolytic enzymes was constructed from the mining of the information gathered after a metagenomic library expressed in *Escherichia coli* in a previous study. This bank was extended with the genomic screening of the versatile actinomycete *Streptomyces coelicolor*. Analysis of the selected enzymes from this bank allowed the identification of a new cold-adapted esterase from *S. coelicolor*. Furthermore, a promising lipase from the metagenomic study was cloned into the heterologous host *E. coli* in order to be expressed and immobilized into the cytoplasm of the cells. These cells were employed as whole-cell catalysts for the efficient synthesis of short-chain carboxylic esters known as important flavours. The biocatalyst produced was used in a small reactor to produce with high yields the important banana flavour, isoamyl acetate. The simplicity and the yields obtained from this whole-cell catalyst suggest it could be used for the mass production of industrially relevant aromas and flavours. Still, lipase optimisation through genetic modifications and creation of large-scale techniques for culture of this whole-cell catalyst are needed before the competitiveness of this biocatalyst can be fully assessed for industrial applications.

Table des matières

Remerciements	iii
Résumé	iv
Abstract	vi
Table des matières	vii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
Préface au chapitre 1	1
Chapitre 1. Introduction	6
1.1 Les esters industriels	7
1.1.1 Description et propriétés physicochimiques	7
1.1.2 Production industrielle	10
1.1.3 Problématique de production industrielle des esters: l'exemple du biodiesel .	12
1.2 Les biocatalyseurs et la chimie verte	15
1.2.1 Les principes de la chimie verte	15
1.2.2 Les biocatalyseurs industriels	16
1.2.3 Les enzymes lipolytiques	18
1.2.4 Le mécanisme catalytique des lipases/estérases	20
1.2.5 Spécificité des lipases	23
1.2.6 Les lipases et la biocatalyse industrielle – les limites actuelles	26
1.2.7 L'immobilisation artificielle des lipases	28
1.2.7.1 L'immobilisation par adsorption	30
1.2.7.2 La liaison covalente	31
1.2.7.3 L'enrobage des enzymes	33
1.2.7.4 La problématique de l'immobilisation artificielle	35
1.2.8. L'immobilisation à l'aide de supports biologiques	36
1.2.8.1 L'utilisation d'enzymes intracellulaires	37
1.2.8.2 L'expression de surface	39

1.3. La découverte de nouvelles lipases	42
1.3.1 Le criblage génomique.....	42
1.3.2 La métagénomique.....	44
1.4. Les streptomycètes	50
1.4.1 Les streptomycètes, des organismes versatiles	50
1.4.2 L'accumulation de lipides de réserve chez les streptomycètes.....	51
1.4.3 Le potentiel lipolytique de <i>S. coelicolor</i>	53
1.5. Objectifs et hypothèses	53
1.5.1 Objectifs.....	53
1.5.2 Hypothèses.....	56
Chapitre 2. Premier article scientifique.....	59
2.1 Préface au chapitre 2.	60
2.1.1 La sélection de gènes lipolytiques chez <i>S. coelicolor</i>	60
2.1.2 Objectifs et hypothèses	60
2.1.3 Présentation du 1 ^{er} manuscrit.....	61
2.2 Contribution des auteurs.....	61
2.3 Résumé.....	61
2.5 Supplemental data	72
2.6 Discussion	74
2.7 Résultats supplémentaires.....	75
Chapitre 3. Deuxième article scientifique.....	79
3.1 Préface au chapitre	80
3.1.1 Les lipases provenant d'une étude métagénomique.....	80
3.1.2 L'immobilisation intracellulaire	83
3.1.3 La biosynthèse d'arômes et fragrances	84
3.1.4 Objectifs et hypothèses	86
3.1.5 Présentation du 2 ^e manuscrit.....	86
3.2 Contribution des auteurs.....	87
3.3 Résumé.....	87
3.5 Supplemental data	97
3.6 Discussion	99

3.7 Résultats supplémentaires.....	105
3.7.1. Introduction.....	105
3.7.2. Criblages fonctionnels préliminaires des enzymes provenant de l'étude métagénomique.....	105
3.7.3 Criblage fonctionnel de la banque lipolytique pour l'affinité envers des arômes et fragrances reconnus.....	107
3.7.4. Évaluation du potentiel d'application industrielle des WCB.....	109
Chapitre 4. Perspectives et conclusion	112
4.1 Perspectives	113
4.1.1. La modification semi-rationnelle des lipases.....	113
4.1.2. La fermentation à haute densité cellulaire et l'amélioration des vecteurs d'expression	115
4.2 Conclusion	117
Annexe I	119
Annexe II.....	121
Annexe III.....	122
Annexe IV	123
Annexe V.....	124
Annexe VI	129
Bibliographie	132

Liste des tableaux

Chapitre 1.

Tableau 1.1. Exemples d'esters d'acides carboxyliques aux propriétés aromatisantes	8
Tableau 1.2. Prix d'honneur du concours présidentiel américain de chimie verte	17
Tableau 1.3. Spécificité des lipases commerciales communes.....	24
Tableau 1.4. Exemples de nouvelles enzymes lipolytiques découvertes à partir d'études métagénomiques	48
Tableau 1.5. Pourcentages des acides gras extraits de cellules entières de <i>S. avermitilis</i> cultivées en milieu MSM modifié.....	52

Chapitre 2.

Table S1. Primers used for amplification of ORFs coding for putative non-secreted lipolytic enzymes of <i>S. coelicolor</i> A3(2)	73
---	----

Chapitre 3.

Tableau 3.1. Activités relatives de la LipIAF5-2 en présence de différents alcools	82
Tableau 3.2. Températures d'ébullition des esters sélectionnés.	103

Annexe I.

Tableau A1 : Gènes sélectionnés suite au criblage génomique de <i>S. coelicolor</i>	119
---	-----

Annexe IV.

Tableau A2. Gènes lipolytiques provenant d'une librairie métagénomique enrichie.....	123
--	-----

Liste des figures

Chapitre 1.

Figure 1.1. Schématisation d'un ester carboxylique.....	7
Figure 1.2. Types de réactions de synthèse d'esters d'acides carboxyliques	11
Figure 1.3. Schématisation du processus industriel de synthèse alcaline du biodiesel à partir de biomasse de grade alimentaire	14
Figure 1.4. Schématisation d'un processus industriel idéal de production de biodiesel par biocatalyse	18
Figure 1.5. Représentation de l'activation interfaciale des lipases.....	19
Figure 1.6. Schématisation du mécanisme d'hydrolyse d'un ester par une lipase	21
Figure 1.7. Réactions enzymatiques effectuées par les lipases.....	22
Figure 1.8. Effets de l'immobilisation sur l'activité lipolytique de la lipase de <i>Candida rugosa</i> (CRL)	30
Figure 1.9. Activation interfaciale d'une lipase lors de son adsorption sur support hydrophobe	31
Figure 1.10. Schématisation de liaisons covalentes entre une lipase et un support artificiel	33
Figure 1.11. Réaction de polymérisation d'un sol-gel.....	34
Figure 1.12. Micrographie de supports de biomasse (BSP) colonisés par <i>Rhizopus oryzae</i>	39
Figure 1.13. Schématisation d'une cellule recombinante exprimant une lipase à sa surface	40
Figure 1.14. Étapes générales d'une étude métagénomique	45
Figure 1.15. Analyse par microscopie électronique de granules lipidiques chez les streptomycètes	51
Figure 1.16. Exemples d'acides gras rares <i>iso</i> - et <i>anteiso</i> - retrouvés chez les streptomycètes	52
Figure 1.17. Schématisation des principales étapes de développement d'un biocatalyseur industriel	55

Chapitre 2.

Figure S1. Specific activities of EstB and EstC toward <i>p</i> NP-C5 at different temperatures	72
---	----

Chapitre 3.

Figure S1. SDS-PAGE (A) and zymogram (B) of purified recombinant LipIAF5-2	97
Figure S2. Fluidized bed reactor scheme	98

Annexe II.

Figure A1. Zymogrammes des souches recombinantes exprimant les gènes de lipases/estérases de <i>S. coelicolor</i>	121
---	-----

Annexe III.

Figure A2. Gels SDS-PAGE, immunobuvardage et zymogramme des lipases/estérases présomptives de <i>S. coelicolor</i> produites chez <i>E. coli</i> BL21(DE3)	122
--	-----

Annexe V.

Figure A3. Zymogrammes des souches recombinantes exprimant les gènes de lipases/estérases issus d'une étude métagénomique	124
Figure A4. Gels SDS-PAGE, immunobuvardages et zymogrammes des lipases issues d'une étude métagénomique et produites chez <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	125
Figure A5. Zymogrammes d'hydrolyse d'esters à chaînes courtes employés comme arômes et fragrances	126
Figure A6. Comparaison de différents biocatalyseurs en cellules entières pour la synthèse de butyrate de méthyle par transestérification	128

Annexe VI.

Figure A7. Effet du milieu de culture sur l'expression recombinante de LipIAF5-2.....	129
Figure A8. Effets d'agents perméabilisant sur la conversion du glycéryle tributyrate en butyrate de méthyle par LipIAF5-2 immobilisée en cellules entières	130
Figure A9. Effets d'agents perméabilisant sur la conversion du glycéryle tributyrate en butyrate de méthyle par LipIAF1-6 immobilisée en cellules entières	131

Liste des abréviations

AGL(s)	Acide(s) gras libre(s)
ASTM	American Society for Testing and Materials
BSP	Particule de support de biomasse
BTMS	<i>n</i> -butyltriméthoxysilane
CALA	Lipase A de <i>Candida antarctica</i>
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CLEA	Cross Linked Enzyme Aggregates
CRL	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
CO ₂	Dioxyde de carbone
CTAB	Bromure de cétyltriméthylammonium
FAME(s)	Méthyle ester(s) d'acide(s) gras
FAEE(s)	Éthyle ester(s) d'acide(s) gras
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCDC(s)	High cell density culture(s)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kDa	kilo Dalton
KOH	Hydroxyde de potassium
MTMS	Méthyltriméthoxysilane
MSTFA	<i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
NADP/NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaF	Fluorure de sodium
p/p	Poids/poids
p/v	Poids/volume
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEG	Polyéthylène glycol
<i>p</i> NP	<i>para</i> -nitrophénol
PPL	Lipase pancréatique porcine
PVA	Alcool polyvinylique

ROL	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
SC-CO ₂	Dioxyde de carbone supercritique
SML	Lipase de <i>Serratia marcescens</i>
TAG(s)	Triacylglycéride(s)
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
TMOS	Tétraméthoxysilane
UI	Unités internationales (en μmole/minute)
WCB	Biocatalyseur en cellules entières

Préface au chapitre 1

L'utilisation d'enzymes par l'Homme remonte au début de la civilisation. Les enzymes étaient à la base de procédés essentiels à la vie courante comme la production d'aliments fermentés (ex. vin, fromage) et le tannage des peaux. Pendant des siècles, les civilisations ont développé divers procédés enzymatiques sans le savoir. Il faudra attendre la seconde moitié du 19^e siècle pour que les bases de la biochimie soient fondées et que des scientifiques comme Wilhelm Kühne proposent le terme «enzyme» pour la première fois. C'est d'ailleurs vers cette période que le chimiste Christian Hansen fut capable d'isoler de la présure pure à partir d'estomacs de veaux. Cette découverte aura un impact majeur pour le monde de la fromagerie et sera à l'origine de la première production industrielle d'enzymes.

Aujourd'hui, avec l'avènement du génie génétique, l'utilisation commerciale d'enzymes se fait dans pratiquement tous les domaines. Des préparations d'enzymes sont couramment employées dans l'industrie alimentaire, cosmétique, pharmacologique et même énergétique avec les biocarburants de deuxième génération. Les enzymes sont utilisées industriellement pour traiter les sucres, les protéines, les lipides et même les acides nucléiques afin de produire des composés à haute valeur ajoutée qui entrent dans la composition de produits d'usage courant. Les pressions des gouvernements et du public pour des produits et des procédés de fabrication plus acceptables d'un point de vue environnemental ont remis l'utilisation des enzymes au goût du jour. Depuis le sommet de la Terre de Rio en 1992, le terme «développement durable» a été largement popularisé et fait maintenant partie prenante des discours politiques ainsi que des régulations de nombreux états. Ce concept se base sur l'intégration d'un développement économique socialement et écologiquement responsables permettant d'assurer la pérennité de toutes les communautés. Ainsi, les préceptes du développement durable sont de plus en plus appliqués dans divers domaines de la production industrielle. L'industrie de la synthèse organique a vu ses concepts modifiés pour donner vie à la chimie verte, qui se veut plus

respectable de l'environnement et de la santé humaine. L'utilisation d'enzymes comme biocatalyseurs pour faire ces réactions de synthèse s'est avérée en adéquation avec ces nouveaux principes de production durable. Aussi, depuis l'avènement de la chimie verte, l'intensité de la recherche sur les biocatalyseurs ne cesse de croître et leur utilisation à grande échelle semble promise à un brillant avenir.

Une forte demande existe donc de la part des industries pour développer de nouveaux procédés de fabrication durables. La progression de ces technologies s'accompagne avec une évolution parallèle des biocatalyseurs afin d'augmenter leur efficacité et productivité. Les procédés industriels employant les biocatalyseurs de première génération se voulaient une simple optimisation des conditions de production et d'utilisation des enzymes. La vaste majorité des méthodes industrielles développées à partir de ces biocatalyseurs se basaient sur l'utilisation d'extraits cellulaires et des processus de fermentations de base avec les limites que cela impliquait. Les techniques de biotransformation se limitaient à l'identification et la culture d'organismes producteurs d'enzymes d'intérêts afin de déterminer empiriquement les conditions optimales de synthèse et d'utilisation de ces enzymes. L'amélioration d'un procédé de biocatalyse quelconque sous-entendait surtout la découverte de nouveaux organismes producteurs d'enzymes non-caractérisées à partir d'échantillons environnementaux. Or, la vaste majorité des microorganismes retrouvés dans la nature ne sont tout simplement pas cultivables dans les conditions contrôlées de laboratoire. Une grande partie de la diversité biologique n'était donc pas accessible aux chercheurs et industriels afin d'améliorer ces procédés. Les avancements de la recherche depuis la fin des années 1990 ont mené à une seconde vague de développement des biocatalyseurs basée directement sur l'évolution artificielle des enzymes grâce aux connaissances structurelles et fonctionnelles des protéines. Ceci a permis d'étendre le spectre de substrats pouvant être transformés *via* la biocatalyse mais aussi d'affiner les méthodes de biotransformation avec des enzymes plus spécifiques et efficaces. D'une part, la cristallographie et les progrès de la bioinformatique ont permis d'envisager la modification rationnelle et/ou aléatoire des

enzymes afin de les améliorer. D'autre part, l'avènement du séquençage à haut débit a aussi permis d'accéder au potentiel génétique des nombreux organismes non-cultivables afin de rechercher de nouvelles séquences correspondant à des biocatalyseurs potentiels. Les quantités phénoménales d'informations issues de ces études ont aussi permis de mieux comprendre les relations entre la structure et la fonction des enzymes. Bien que très prometteur, très peu des biocatalyseurs issus de ces recherches ont fait leur chemin jusqu'au monde industriel si bien qu'aujourd'hui encore, on fait appel à diverses combinaisons de ces approches afin d'améliorer continuellement les enzymes connues dans une approche dite combinatoire. Il s'agit d'une technique récente qui, selon certains, pourrait donner le jour à une troisième vague d'optimisation de biocatalyseurs. Le développement d'outils informatiques puissants capables de prédire avec plus de justesse la relation entre la structure et la fonction des enzymes permet une optimisation *in silico* des enzymes. Couplée à la synthèse chimique de gènes, cette approche permet d'envisager la création *de novo* de biocatalyseurs mais peut aussi servir simplement à modifier des biocatalyseurs existants. Ces biocatalyseurs de demain seront un jour capables de répondre à des besoins appliqués très spécifiques en ayant des propriétés uniques, voir inusitées, pour lesquelles ils n'ont pas été sélectionnés à l'origine par l'évolution naturelle.

Parmi les enzymes les plus couramment employées d'un point de vue industriel, mentionnons les enzymes lipolytiques comme les lipases et les estérases. Ces enzymes, ubiquitaires à toutes formes de vie, catalysent normalement l'hydrolyse de lipides à l'interface eau/lipides. Les lipases/estérases constituent à ce jour l'un des plus importants groupes d'enzymes employés dans les applications biotechnologiques. Ces enzymes sont parties intégrantes de produits comme les détergents, les produits alimentaires ainsi que certains produits pharmaceutiques en plus d'être employées dans divers procédés industriels de fabrication comme la synthèse d'arômes et de parfums, la résolution chirale de composés pharmaceutiques et même la bioremédiation de sols contaminés pour ne citer que quelques exemples. Les enzymes lipolytiques se démarquent des autres classes

d'enzymes de par leur grande diversité catalytique, leur capacité à fonctionner en absence de cofacteurs et leur résistance aux solvants organiques employés dans de nombreux processus de production industrielle. Malgré leur large éventail de substrats, les lipase/estérases sont reconnues pour être hautement spécifiques en termes de chimio-, régio- et énantiosélectivité. De plus, dans certaines conditions de micro-hydratation, les lipases/estérases possèdent la faculté intéressante de faire des réactions de synthèse de dérivés lipidiques. Toutes ces propriétés sont hautement prisées par l'industrie qui cherche à employer de plus en plus les lipases/estérases comme catalyseurs dans divers procédés de synthèse.

Il reste cependant beaucoup de recherche à faire avant de pouvoir envisager une utilisation compétitive des enzymes lipolytiques pour le remplacement de procédés de fabrication basés sur la chimie classique. Il est important d'améliorer leur stabilité (thermique et chimique) mais aussi leur activité catalytique dans des conditions industrielles. Bien qu'efficaces, il est généralement admis que les procédés enzymatiques sont beaucoup plus lents que les procédés chimiques. Il est donc crucial d'améliorer l'efficacité catalytique des enzymes afin de réduire les temps de production mais aussi la quantité d'enzyme employée dans un processus quelconque. En effet, malgré les progrès de la biotechnologie, les enzymes lipolytiques constituent encore à ce jour un produit à valeur ajoutée en soi ce qui limite leur utilisation à certaines niches. Étant donné la difficulté de produire ces enzymes en grande quantité et à faibles coûts, l'amélioration catalytique des enzymes est souvent à la base de leur utilisation compétitive par rapport aux procédés chimiques classiques disponibles aux industriels. Ceci est particulièrement vrai pour la production des molécules à faible valeur ajoutée qui sont produites en très grande quantité comme la myriade de composés issus du pétrole (ex. carburants, plastiques, produits chimiques de masse, etc.). Les dérivés de la pétrochimie restent à ce jour les composés les plus employés par l'Homme, ce qui en fait l'une des industries les plus rentables au monde mais aussi l'une des plus polluantes. Les lipases commerciales disponibles à ce jour sont simplement trop chères (ou pas assez efficaces) pour envisager

leur utilisation à grande échelle dans des procédés durables de synthèse de molécules analogues aux dérivés du pétrole. Les meilleures lipases commerciales disponibles à ce jour ne peuvent encore compétitionner avec les catalyseurs chimiques pour des applications de masse comme les biocarburants, les bioplastiques ainsi que la production de molécules intermédiaires de moindre importance en termes de volumes. Leur utilisation rentable se limite pour l'instant surtout à des molécules de haute valeur ajoutées et employées en petites quantités relatives pour la fabrication de détergents, d'arômes ou de composés pharmaceutiques. La production des lipases, leur purification et leur immobilisation constitue à ce jour les principaux facteurs affectant leur utilisation rentable par rapport aux catalyseurs chimiques. Les compagnies productrices de ces enzymes doivent maintenant trouver des moyens simples et efficaces pour produire et immobiliser ces enzymes à moindres coûts afin de pouvoir ouvrir les niches d'utilisation à des marchés de moindre valeur ajoutée mais de plus grand volume. C'est avec le développement de ces marchés que les impacts de la biocatalyse se feront réellement sentir au niveau environnemental et économique.

Les travaux de recherche présentés dans ce document ont été réalisés en partenariat avec l'industrie privée. Aussi, le lecteur doit garder en tête que les objectifs des industries biotechnologiques sont souvent différents, quoique complémentaires, de ceux de la recherche fondamentale. Le but ultime de cette recherche se voulait donc de répondre adéquatement à ces impératifs, ce qui a en grande partie orienté l'approche expérimentale employée. Les études menées se voulaient à mi-chemin entre la biologie fondamentale et appliquée afin de satisfaire aux exigences de tous les partenaires ayant participé au projet. Le présent travail de recherche se veut donc une piste de solution sur des approches simples et peu onéreuses de produire, immobiliser et employer des lipases afin de synthétiser des molécules d'intérêt industriel.

Chapitre 1. Introduction

1.1 Les esters industriels

1.1.1 Description et propriétés physicochimiques

Les esters forment une classe de composés chimiques très répandus dans la nature. La plupart des molécules impliquées dans les réactions biochimiques de la vie contiennent des liens esters. Les esters sont donc ubiquitaires à toute forme de vie avec une prédominance dans les molécules de réserve énergétique sous la forme de triglycérides (esters de glycérol). Typiquement, un ester est formé par la condensation d'un oxoacide (acide contenant au moins un atome d'oxygène) et d'un alcool ou d'une molécule contenant un groupement hydroxyle. Par exemple, les liens phosphodiester qui forment la structure de l'ADN sont issus de la condensation d'un acide inorganique (groupement phosphate) et de l'hydroxyle d'un désoxyribose (furanose). Alternativement, les esters peuvent provenir de la condensation d'un acide carboxylique et d'un alcool pour donner une molécule où un lien carbonyle (liaison double carbone-oxygène) se retrouve couplé à un lien éther (liaison simple carbone-oxygène) (Figure 1.1).

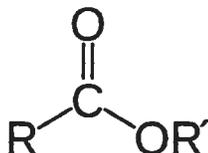
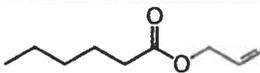
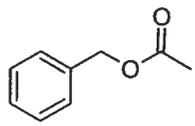
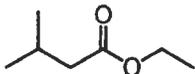
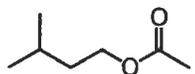
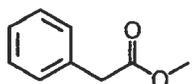
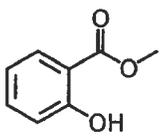
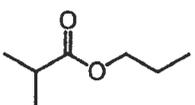


Figure 1.1. Schématisation d'un ester carboxylique. R dénote une chaîne carbonée alors que R' représente un groupement alkyle. Les deux groupements peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques.

Les esters carboxyliques sont très répandus et fortement employés dans l'industrie. Les propriétés physicochimiques de ces esters sont nombreuses et dépendent surtout de leur masse moléculaire. Les esters de faible poids moléculaire sont généralement très volatiles et ont des propriétés «aromatisantes» agréables qui rappellent les fruits et les fleurs (Tableau 1.1). Ils sont d'ailleurs souvent les principales molécules à contribuer à l'arôme d'un fruit ou d'un extrait végétal naturel [1]. Les esters de glycérol (glycérides) sont très employés dans l'industrie alimentaire et cosmétique. Il suffit de

penser aux nombreux types de produits laitiers et aux produits de maquillage pour retrouver des glycérides variés. Par exemple, les mono-esters de glycérol dérivés des acides gras comme le *rac*-2,3-dihydroxypropyle palmitate sont souvent employés comme émoullients dans les cosmétiques et comme agents émulsifiants dans l'industrie alimentaire [2]. Par ailleurs, plusieurs esters d'alcools polyhydriques comme l'éthylène glycol ou le xylitol forment des composés amphiphiles aux propriétés émulsifiantes qui sont aussi très prisées par les industries alimentaires. Enfin, des esters de mono- et disaccharides formés par la condensation de sucres (ex. glucose, sucrose) avec des acides gras forment aussi d'excellents surfactants pour l'industrie alimentaire à cause de leur absence de toxicité et de leur excellente stabilité [3].

Tableau 1.1. Exemples d'esters d'acides carboxyliques aux propriétés aromatisantes.

Nom de l'ester	Formule chimique	Propriété organoleptique/ principale source naturelle
Hexanoate d'allyle		Ananas
Acétate de benzyle		Pêche, fraise, jasmin
Isovalérate d'éthyle		Pomme
Acétate d'isoamyle		Pêche, banane
Phénylacétate de méthyle		Miel
Salicylate de méthyle		Menthe givrée
Isobutyrate de propyle		Rhum

La plupart des esters carboxyliques sont aussi reconnus pour avoir d'excellentes propriétés de solvation de par leur nature amphiphile. Ils sont plus polaires que les éthers, mais moins que les alcools. Ces esters sont capables d'accepter des liens hydrogènes mais ne peuvent en donner ce qui fait qu'ils sont plus volatiles que les acides carboxyliques de masse équivalente. Cette capacité leur confère aussi une certaine solubilité dans l'eau ce qui en fait aussi des solvants organiques versatiles. De plus, la nature relativement labile du lien ester fait qu'ils sont aussi peu toxiques et généralement biodégradables dans l'environnement. Toutes ces propriétés font des esters d'acides carboxyliques d'excellents biosolvants pour une multitude d'applications industrielles allant de l'utilisation comme ingrédients de base dans les encres d'imprimerie ou comme composants dans divers produits dégraissants commerciaux [4].

Les esters de masse moléculaire plus élevée ont souvent d'excellentes propriétés lubrifiantes et peuvent servir de substituts aux produits pétrochimiques lourds. Les esters d'octanol comme l'oléate d'octyle sont reconnus pour avoir des points d'éclair très élevés en plus d'avoir une bonne résistance à l'oxydation et d'excellentes propriétés lubrifiantes [5]. Ces caractéristiques en font des molécules de base pour la production d'huiles synthétiques performantes comme des huiles hydrauliques ou des huiles à moteurs totalement biodégradables. On se sert aussi d'esters de méthyle et d'éthyle d'acides gras à chaînes longues (12 atomes de carbone ou plus) comme carburants alternatifs pour les avions, les trains et les camions avec le biokérosène et le biodiesel. Ces esters produits ont souvent sensiblement les mêmes propriétés physico-chimiques et presque la même densité énergétique que les carburants fossiles [6, 7]. Leur utilisation se veut d'ailleurs directe car ils peuvent être employés sans modifications majeures des engins modernes. Ils sont issus de la transestérification d'huiles végétales ou de graisses animales et sont donc totalement renouvelables en plus produire beaucoup moins d'émissions polluantes que les carburants fossiles. Enfin, il est aussi possible de produire des polymères d'esters aux propriétés quasiment infinies. Ces polyesters sont employés pour produire des résines et des thermoplastiques hautement résistants qui entrent dans la composition

d'approximativement tous les objets manufacturiers allant de la simple bouteille de plastique aux vêtements en passant par les écrans à cristaux liquides. La nature chimique des monomères employés confère une infinité de propriétés aux polymères produits. La production annuelle mondiale de ces plastiques à base de polyesters dépasse les millions de tonnes et provient actuellement en majeure partie de dérivés du pétrole [8].

1.1.2 Production industrielle

Les esters carboxyliques peuvent être produits industriellement par une réaction de substitution entre deux esters (transestérification), par estérification directe d'un acide carboxylique (typiquement un acide gras libre, AGL) ou par substitution entre deux acides sur un même alcool (interestérification) (Figure 1.2). Les réactions de synthèse chimique emploient deux types de catalyseurs, homogènes ou hétérogènes. Les catalyseurs homogènes sont des complexes organométalliques ou des composés généralement dissous dans la même phase que les réactifs (ex. méthoxyde de potassium, hydroxyde de potassium). Les catalyseurs hétérogènes sont non-miscibles avec les réactifs et ils sont généralement sous forme solide (ex. oxydes de strontium) ce qui permet leur récupération pour des réactions subséquentes. La réaction la plus employée industriellement pour la synthèse d'esters carboxyliques, la réaction de Fischer, implique une catalyse acide (voir Figure 1.2-B). Afin de déplacer l'équilibre de la réaction vers les produits, un excès stoechiométrique d'alcool ou d'acide carboxylique est souvent employé [2]. De plus, comme la réaction est réversible, il est important d'extraire *in situ* l'eau formée par la réaction via des techniques élaborées. Pour accélérer la réaction, les réactifs sont souvent chauffés en conditions de reflux ce qui est relativement énergivore à grande échelle. De plus, l'efficacité de ce procédé est limitée par l'encombrement stérique des alcools employés. Les rendements de synthèse vont dans l'ordre décroissant des alcools primaires aux alcools tertiaires. On peut aussi obtenir artificiellement des esters par réaction avec des halogénures d'acides ou des anhydrides d'acides en présence de bases faibles, mais ces réactions sont souvent très coûteuses, dangereuses et ne sont que

peu employées à grande échelle. Enfin, il n'est pas rare que les réactions soient incomplètes en plus de produire des sous-produits indésirables car les catalyseurs employés sont peu spécifiques [2]. Ceci augmente grandement la complexité des procédures de purification des esters produits et incidemment, leur coûts de production [9].

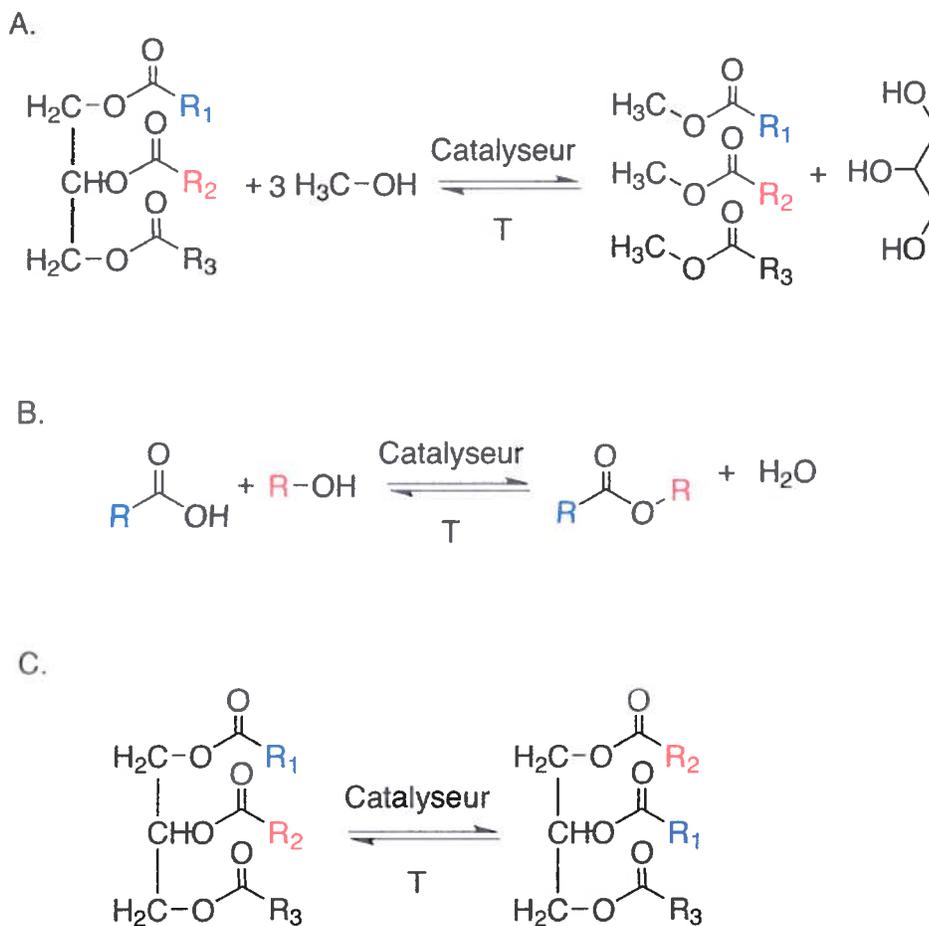


Figure 1.2. Types de réactions de synthèse d'esters d'acides carboxyliques. A. Transestérification. B. Estérification. C. Interestérification.

1.1.3 Problématique de production industrielle des esters: l'exemple du biodiesel

La production industrielle d'esters d'acides gras se heurte à des problèmes de restrictions des types de synthons qui peuvent être employés efficacement ainsi qu'à la présence inhérente de sous-produits qui augmente les difficultés de purification des produits finaux. Étant un domaine nouveau, la documentation sur les problèmes de production industrielle d'esters carboxyliques employés comme arômes et fragrance est relativement peu abondante. Il a donc été décidé de présenter au lecteur une revue de la problématique industrielle associée au biodiesel, un ester carboxylique à chaîne longue pour lequel les procédés de fabrication sont semblables. Hormis la nature chimique des esters qui composent le biodiesel, ces procédés présentent essentiellement les mêmes problématiques et limitations. La présentation du biodiesel se veut donc un exemple bien documenté afin d'illustrer les difficultés rencontrées par les industriels qui emploient principalement la réaction de Fischer pour produire ces molécules d'intérêt.

Le biodiesel est un dérivé des graisses et des huiles animales ou végétales qui possède essentiellement les mêmes propriétés physico-chimiques que le pétrodiesel [7]. Il est obtenu par transestérification alcaline entre ces triglycérides et un alcool primaire (méthanol ou éthanol) afin de produire un méthyle ou éthyle ester d'acide gras formé de 12 à 22 atomes de carbone par molécule [7, 10, 11]. Le procédé emploie un catalyseur dit « homogène », soit l'hydroxyde de sodium (NaOH) ou le méthoxyde de potassium (KMeO) [12]. La réaction complète permet de libérer une molécule de glycérol tout en formant trois molécules de biodiesel (voir Figure 1.2-A). Il faut donc un ratio molaire alcool/triglycéride minimal de 3:1 pour convertir tous les triglycérides en esters de méthyle (FAME : Fatty Acid Methyl Ester) ou d'éthyle (FAEE : Fatty Acid Ethyl Ester). Théoriquement, n'importe quel type de triglycéride peut être employé avec n'importe quel type d'alcool. Néanmoins, pour des questions de rendements et de rentabilité, la plupart des usines modernes de biodiesel emploient des huiles végétales et le méthanol [13, 14].

À ce jour, ce procédé est celui qui offre les meilleurs rendements de transestérification avec des réactions complètes à 99% en une à deux heures [15]. Le processus complexe comprend de nombreuses étapes et est résumé à la Figure 1.3. Cette complexité est attribuable aux problèmes rencontrés lors de la synthèse du biodiesel. Premièrement, la réaction est réversible et un excédant de catalyseur (1 à 2% p/p) et d'alcool est nécessaire pour pousser la réaction vers les produits (typiquement de 6 :1 jusqu'à 20:1 de ratio stoechiométrique). Il faut aussi chauffer la réaction (55-80°C) afin d'obtenir une bonne vitesse de réaction ce qui ajoute au coût énergétique du procédé [13]. L'excès de catalyseur et d'alcool ajoute des composés indésirables qui doivent impérativement être enlevés à grands frais afin de rencontrer les normes de certification (ASTM Biodiesel Standard D6751, www.astm.org) [10]. La transestérification alcaline ne fonctionne pas en présence d'AGLs et d'eau. La présence de ces deux contaminants, même en faible concentration, neutralise le catalyseur en promouvant une réaction de saponification qui émulsifie les phases de glycérol et les esters d'acyle rendant leur séparation difficile [16, 17]. Ceci limite grandement le type de biomasse source qui peut être employé à des huiles ou des graisses de qualités supérieures (grades alimentaires) contenant typiquement 0,5% (p/p) ou moins d'AGLs [10, 16, 18, 19]. L'utilisation de biomasses raffinées entre directement en compétition avec les besoins alimentaires des nations et ne répond pas aux concepts de développement durable que l'on devrait respecter dans la production de biocarburants [20]. De plus, le prix moyen de ces huiles est souvent plus cher au litre que le pétrodiesel et ce, avant même tout processus de transformation [19]. Enfin, la purification du biodiesel se fait par extraction en phase aqueuse acidifiée pour retirer toutes traces de savons, de catalyseur, de sels, d'alcool et de glycérol des esters. Cette étape cruciale produit 0,2 tonne d'eau usée par tonne de biodiesel. Cette eau, riche en sels phosphatés, en AGLs, en savons et en glycérol n'est pas traitée pour l'instant et constitue une source potentielle d'eutrophisation des cours d'eau [21]. Le biodiesel ainsi « lavé » doit ensuite être séché pour enlever toute trace d'eau. L'apport supplémentaire d'énergie nécessaire à la réaction, mais aussi à la purification

des esters produits, augmente considérablement les coûts de production du biodiesel et s'ajoutent aux coûts relativement élevés de la biomasse employée au départ. Ainsi, le coût actuel du biodiesel en Amérique du Nord est en moyenne de 1,5 à 3 fois plus élevé que le diesel conventionnel et doit donc être subventionné pour être compétitif [10, 22].

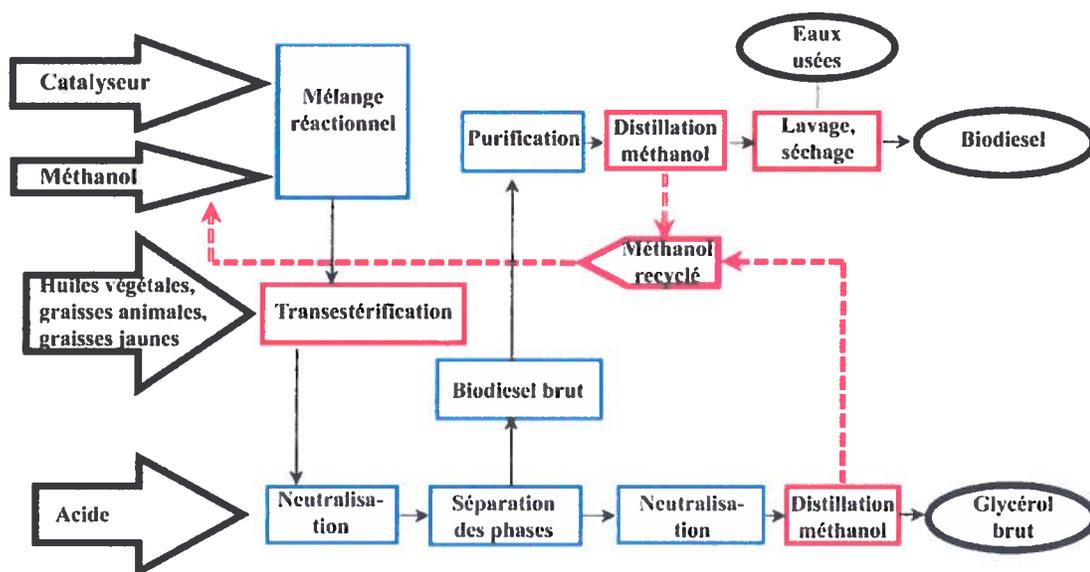


Figure 1.3. Schématisation du processus industriel de synthèse alcaline du biodiesel à partir de biomasse de grade alimentaire. Les encadrés rouges représentent des étapes nécessitant un chauffage, les flèches représentent des intrants, les rectangles, les étapes de synthèse et de purification et les cercles, les produits du procédé. Adapté de [22].

Afin d'augmenter la rentabilité de la production de biodiesel, plusieurs entreprises se sont réorientées vers l'utilisation de biomasses alternatives comme des huiles et graisses usagées. L'ensemble des graisses animales et des huiles végétales rejetées par l'industrie alimentaire forme une biomasse appelée « graisse jaune ». La graisse jaune se vend de 0,20 US\$ à 0,44 US\$ le kg soit environ 2,5 fois moins cher que les huiles comestibles [10, 18, 22, 23]. Néanmoins, l'utilisation de ces graisses, qui peuvent contenir jusqu'à 15% d'AGLs et de 3 à 5% d'eau, présente de nouveaux défis pour l'industrie [23]. Des

procédés de catalyse acide ont été développés mais ils sont encore plus lents, polluants, corrosifs et énergivores que la transestérification alcaline [16].

Les problèmes associés à la production industrielle de biodiesel sont typiques des procédés de synthèse de la plupart des esters. Les problèmes de limitations au niveau des synthons employés, de présence de sous-produits et des difficultés de purification sont inhérents à la synthèse de tous les types d'esters d'acides organiques. À cela s'ajoute le volet de l'acceptabilité environnementale du procédé qui peut jouer sur la rentabilité de l'entreprise. En effet, il y a de plus en plus de demande pour des produits de synthèse ayant un label naturel ou certifiés éco-responsables [24]. Le développement de procédés de fabrication permettant d'avoir cette certification peut rendre une entreprise plus compétitive même si les coûts de production s'en trouvent plus élevés. En fait, la rentabilité des procédés varie en fonction de la valeur des esters produits. L'utilisation de procédés alternatifs de synthèse moins complexes et ayant une moins grande empreinte environnementale s'avère primordiale pour des productions de masse d'esters de faible valeur ajoutée comme le biodiesel, les arômes ou les bioplastiques. Un procédé vert et efficace permettrait d'augmenter la rentabilité et l'image corporative de ces entreprises [24].

1.2 Les biocatalyseurs et la chimie verte

1.2.1 Les principes de la chimie verte

La chimie verte se veut une vision plus environnementale et socialement acceptable de la chimie de synthèse. Basée sur les préceptes du développement durable, la chimie verte regroupe 12 concepts qui visent à réduire la pollution à la source (United States Environmental Protection Agency : www2.epa.gov/green_chemistry). Ces concepts peuvent être regroupés en quatre grands thèmes :

1. **Valorisation de la biomasse** : Conceptualiser des procédés de fabrication qui maximisent la transformation de matières premières renouvelables en produits finis.
2. **Santé et sécurité** : Employer au maximum des composés moins dangereux et non-toxiques pour l'environnement et la santé des travailleurs. Cibler la synthèse et l'utilisation de composés biodégradables.
3. **Énergie** : Conceptualiser des procédés de fabrication qui maximisent l'efficacité énergétique.
4. **Zéro déchets**: Créer des procédés de fabrication qui ne produisent pas de déchets ou qui permettent de revaloriser ces déchets.

La chimie verte peut s'appliquer à l'utilisation de catalyseurs chimiques dans des procédés de synthèse plus écologiques. Cependant, il est grandement accepté que l'emploi de biocatalyseurs (enzymes ou micro-organismes vivants) permet de répondre beaucoup plus adéquatement aux principes qui la régissent. Le cas de la synthèse du 1,3-propanediol par des bactéries *E. coli* recombinantes est un bon exemple d'un procédé de chimie verte. Les bactéries emploient beaucoup moins d'énergie et sont beaucoup moins dommageables pour l'environnement que la réaction classique d'hydratation de l'acroléine, un composé carcinogène reconnu [25]. La biocatalyse se veut une alternative viable à la chimie classique qui emploie habituellement des complexes métalliques ou organiques dans divers procédés de synthèse industrielle [26].

1.2.2 Les biocatalyseurs industriels

L'utilisation de biocatalyseurs est un marché mondial de plus de 7 milliards de dollar en 2013 avec une croissance annuelle d'environ 6% [27]. La biocatalyse consiste en l'emploi d'enzymes ou de micro-organismes pour faire des réactions «non-naturelles» d'un point de vue évolutif. Les applications vont de la synthèse de précurseurs de

molécules pharmaceutiques à la production de biocarburants de 3^e génération (Tableau 1.2).

Tableau 1.2. Prix d'honneur du concours présidentiel américain de chimie verte. Adapté de [26].

Produit	Technologie	Compagnie	Année
Acide succinique pour la synthèse organique	Fermentation	BioAmber	2011
1,4-butanediol pour la synthèse organique	Fermentation	Genomatica	2011
Alcools lourds pour la synthèse organique	Fermentation	UCLA (Prof. J. Liao)	2010
Pétrole renouvelable à partir des intermédiaires du métabolisme des acides gras	Fermentation	LS9	2010
Synthèse de Sitagliptine (médicament contre le diabète)	Enzyme	Merck/Codexis	2010
Esters pour les cosmétiques	Enzyme	Eastman Chemical Co.	2009
Synthèse d'artovastatine (médicament contre le cholestérol)	Enzyme	Codexis	2006
Polyhydroxycanoates comme bioplastiques	Fermentation	MetaboliX	2005
Graisses à faibles concentrations de gras <i>trans</i>	Enzyme	ADM/Novozymes	2005
Rhamnolipides	Fermentation	Jeneil Biosurfactant Company	2004
Amélioration du recyclage du papier	Enzyme	Buckman Laboratories International	2004
Synthèse de polyesters avec des lipases	Enzyme	Université Polytechnique (Prof. R. Gross)	2003

La vaste majorité des enzymes employées sont de sources microbiennes étant donné leur grande diversité génétique et la simplicité des procédés de production des enzymes à partir de ces organismes. L'utilisation d'enzymes permet de créer des procédés plus spécifiques, plus sélectifs et ce, dans des conditions de synthèse plus douces. La biocatalyse permet ainsi de simplifier grandement les étapes de synthèse de composés organiques commerciaux. Par exemple, la synthèse de biodiesel par biocatalyse se limite à seulement trois étapes principales car les enzymes utilisées sont hautement spécifiques et ne produisent pas de sous-produits (Figure 1.4) [16]. Les étapes de purification des esters de méthyle produits se limitent à une simple décantation du glycérol et à une

récupération de l'excédant de méthanol s'il y a lieu. Dans ce cas-ci, la réaction se fait à basse température (35-50°C) en présence d'enzymes lipolytiques comme biocatalyseurs. Ceux-ci sont sous forme hétérogène ce qui permet leur réutilisation pour une synthèse ultérieure [28]. De plus, les enzymes sont plus polyvalentes que les catalyseurs chimiques et peuvent traiter une biomasse recyclée contenant de l'eau et des AGLs ce qui permet de réduire substantiellement les coûts de production du biodiesel [13, 16, 19, 28, 29].

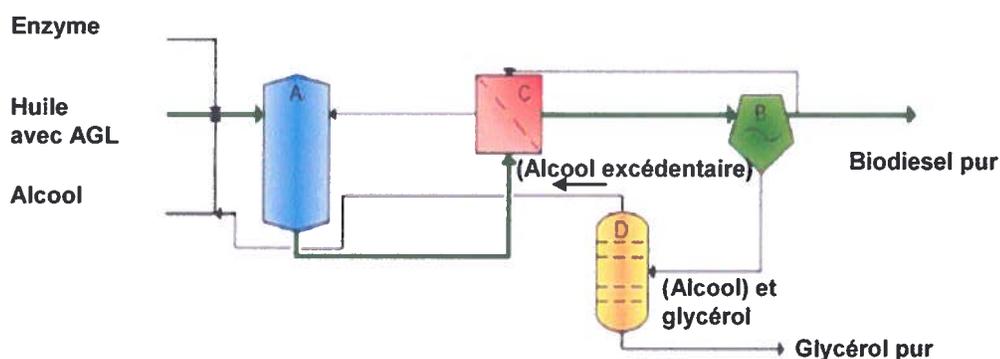


Figure 1.4. Schématisation d'un processus industriel idéal de production de biodiesel par biocatalyse. A. Bioréacteur. B. Unité de décantation. C. Filtre. D. Distillateur (facultatif). À noter que l'alcool excédentaire est entre parenthèses pour souligner son caractère facultatif. Adapté de [29].

1.2.3 Les enzymes lipolytiques

Les enzymes lipolytiques sont des enzymes qui font partie de la super famille des α/β hydrolases. Elles hydrolysent naturellement les triglycérides en AGLs. Parmi cette famille, on retrouve les carboxylestérases (EC 3.1.1.1) et les lipases (EC 3.1.1.3). Alors que les estérases ont une préférence marquée pour des triglycérides ayant des acides gras à chaînes courtes (10 atomes de carbone ou moins), les lipases (triacylglycérol hydrolases) ont une affinité pour des substrats avec de longues chaînes d'acides gras (10 carbones ou plus) [30]. Par définition, les estérases emploient préférentiellement des substrats miscibles dans l'eau alors que les lipases sont activées par l'interface créé entre

le milieu aqueux et les substrats insolubles [30]. Cette activation interfaciale typique découlerait d'un changement de conformation de la structure de l'enzyme attribuable à des résidus hydrophobes formant un domaine mobile à la surface de l'enzyme et appelé le couvercle. Le déplacement du couvercle à une interface huile/eau par exemple permettrait d'exposer le site actif de l'enzyme au substrat (Figure 1.5). Ce sont ces résidus d'ailleurs qui confèrent aux lipases un caractère amphiphile typique [31]. La présence d'eau dans l'entourage des lipases est donc très importante afin d'obtenir la bonne conformation de la structure de l'enzyme [29, 30, 32, 33]. Néanmoins, certaines lipases sont reconnues pour ne pas posséder de couvercle et ainsi ne pas répondre au phénomène d'activation interfaciale. Parmi ces enzymes, mentionnons la lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435) qui est plus active lorsque la concentration d'eau est très faible [34].

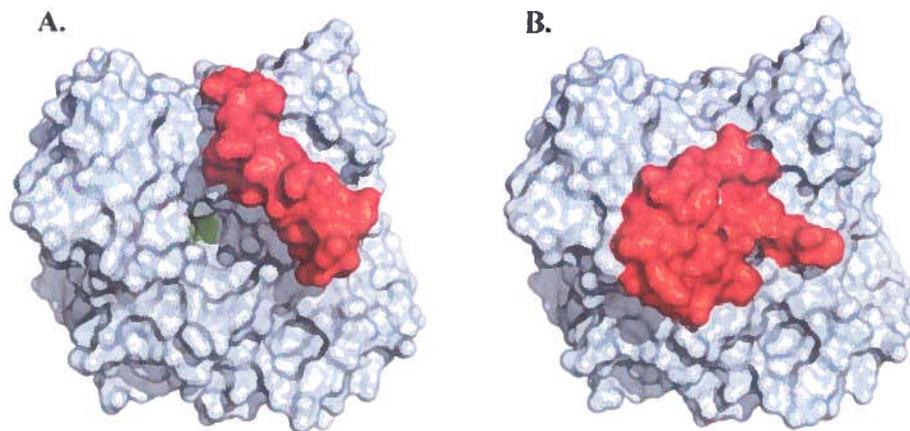


Figure 1.5. Représentation de l'activation interfaciale des lipases. Structures cristallines de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) A. CRL représentée sous sa conformation ouverte en présence de solvants organiques simulant l'activation interfaciale (PDB 1CRL). B. CRL sous sa conformation fermée dans un milieu aqueux (PDB 1TRH). Les résidus en rouge représentent le couvercle et ceux en vert, le site actif. Adapté de [35].

La structure associée aux α/β hydrolases est constituée de trois résidus catalytiques chez les lipases: un résidu nucléophile (typiquement une sérine), un résidu catalytique acide (aspartate ou glutamate) et un résidu de coordination histidine, toujours dans cet ordre dans la structure primaire de l'enzyme [36]. Le résidu nucléophile est situé

sur un motif consensus Gly-X-Ser-X-Gly hautement conservé chez les lipases/estérases sauf pour les lipases de la famille des GDSL [37]. Ce résidu se situe typiquement sur un feuillet β qui forme un coude avec des angles de torsion ϕ et ψ défavorables sur la chaîne principale [38, 39]. Une autre particularité structurale des lipases/estérases est la présence de quatre sous-sites de liaison pour les substrats. Un de ces sous-sites forme une poche oxyanionique qui stabilise l'intermédiaire produit lors de l'hydrolyse du substrat alors que les trois autres cavités servent à accueillir chaque chaîne acyle du triglycéride. Les dimensions de ces cavités et les résidus qui les forment déterminent la spécificité de l'enzyme [30, 40]. Mis à part le motif consensus, les lipases/estérases présentent une très grande hétérogénéité de séquence et les deux classes sont difficilement différenciables uniquement par leurs séquences primaires [31]. Néanmoins, les lipases microbiennes sont tout de même classées en différentes familles en fonction de leur homologie de séquence avec des membres caractérisés [30]. De nouvelles banques de lipases utilisant des algorithmes plus puissants ont vu le jour comme la «Microbial Esterase and Lipase Database» (MELDB; www.gem.re.kr/melddb/) même si la discrimination entre estérase et lipase n'est pas parfaite pour tous les cas recensés [41]. La banque «LIPABASE» (www.lipabase-pfba-tun.org) se veut une sélection de vraies lipases basée sur la caractérisation biochimique [41, 42]. Enfin, la banque «Lipase Engineering Database» (LED; www.led.uni-stuttgart.de/) est une compilation plus exhaustive avec 38 superfamilles de lipases comprenant à ce jour au moins 18 585 protéines différentes et 1117 structures tridimensionnelles [43].

1.2.4 Le mécanisme catalytique des lipases/estérases

Le mécanisme catalytique d'un lien ester par les lipases/estérases emploie deux substrats et répond au modèle classique de Ping-Pong Bi-Bi avec libération de deux produits [30, 44, 45]. Il commence par la formation d'un intermédiaire acyle-enzyme suite à l'attaque nucléophile du carbonyle du lien ester (1^{er} substrat) par la sérine activée par une histidine proximale. Le groupement alcool de l'ester est libéré (1^{er} produit) et

l'intermédiaire tétraédrique (enzyme modifiée) formé entre l'enzyme et l'acide gras est stabilisé par des liens hydrogènes proximaux provenant de chaînes latérales situées au centre oxyanionique. L'histidine proximale active ensuite une molécule d'eau (2^e substrat) qui attaque la forme acylée de l'enzyme ce qui libère l'acide gras (2^e produit) et régénère du même coup l'enzyme (Figure 1.6).

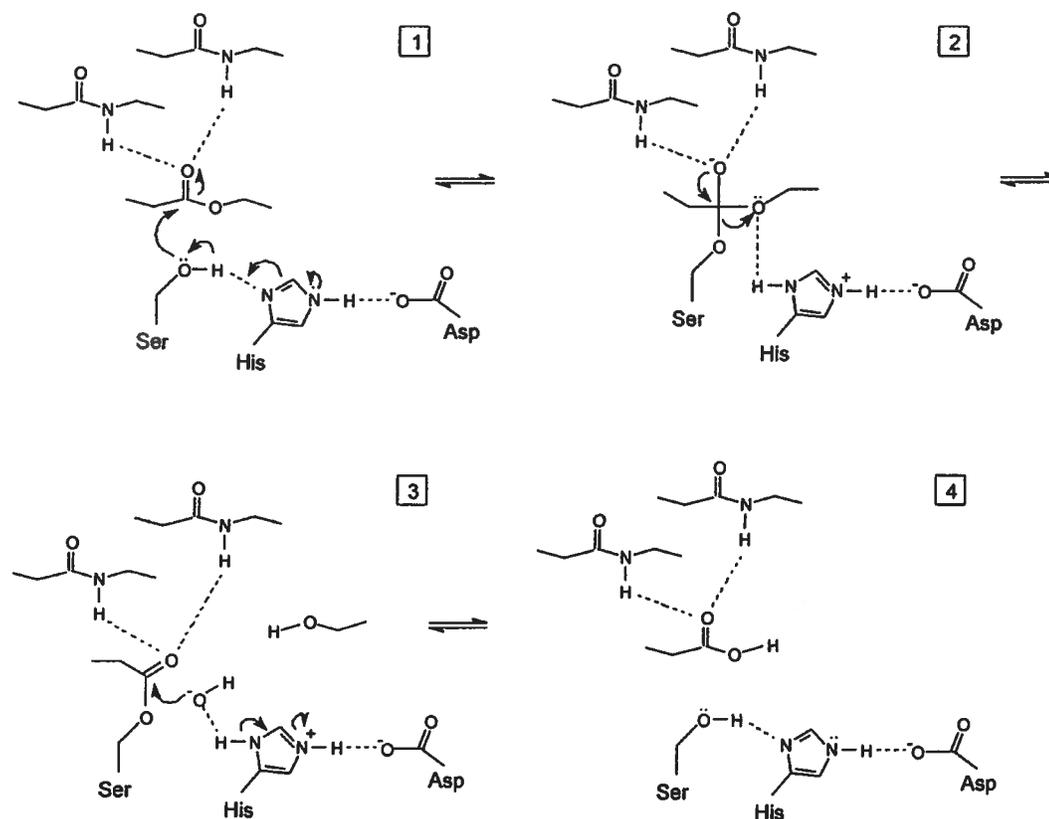


Figure 1.6. Schématisation du mécanisme d'hydrolyse d'un ester par une lipase. (1) Attaque nucléophile du carbonyl de l'ester par la sérine. (2) Formation d'un intermédiaire tétraédrique entre l'acide gras et l'enzyme. (3) Activation d'une molécule d'eau proximale par l'histidine et attaque nucléophile du carbonyl de l'intermédiaire menant à la libération de l'acide gras et à une réactivation de l'enzyme (4). Reproduit de [30].

En fonction des conditions du milieu réactionnel, les lipases⁽¹⁾ peuvent effectuer plusieurs réactions. La réaction classique d'hydrolyse d'un triglycéride afin de libérer un alcool (le glycérol) et un acide gras ne peut se dérouler qu'en présence d'eau (Figure 1.7-A). Il s'agit d'une réaction réversible qui n'est poussée thermodynamiquement que par l'équilibre entre les substrats et les produits. Par contre, les lipases sont aussi actives dans des conditions de micro-hydratation. Dans de telles conditions, elles sont capables d'effectuer des réactions inverses de synthèse. Les lipases peuvent faire des réactions d'estérification (couplage d'un alcool à un acide gras) et de transestérification (interestérification; migration d'un acide gras entre deux alcools, alcoolyse; migration d'alcools sur un acide gras, acidolyse; substitution d'un acide gras par un autre) (Figure 1.7-B) [9]. La réaction de synthèse emploie le même mécanisme que pour l'hydrolyse mis à part le fait que c'est le groupement hydroxyle d'une molécule proximale d'alcool qui agit comme nucléophile pour attaquer l'intermédiaire enzyme-acyle [29, 46].

A. Hydrolyse



B. Synthèse

1) Estérification



2) Interestérification



3) Alcoolyse



4) Acidolyse



Figure 1.7. Réactions enzymatiques effectuées par les lipases. A. Réaction d'hydrolyse en présence d'eau. B. Réactions de synthèses effectuées en absence d'eau. Adapté de [9].

¹(1) Afin de simplifier la lecture, le terme lipase désignera dorénavant l'ensemble des enzymes lipolytiques (estérases et lipases) à moins d'une spécification du contraire.

1.2.5 Spécificité des lipases

Les lipases peuvent être classées en trois groupes selon leur spécificité envers les triglycérides. La plupart des lipases bactériennes sont dites non-spécifiques et peuvent hydrolyser au hasard les liens esters d'un triglycéride (situés sur le carbone 1, 2 ou 3 du glycérol). Les lipases du deuxième groupe sont régio-spécifiques et peuvent hydrolyser seulement les liens esters primaires (1,3-spécifiques). Le troisième groupe est spécifique aux monoglycérides d'un seul type bien que cette catégorie ne comprenne aucune lipase bactérienne. Parmi les lipases commerciales les plus employées, la lipase de type B de *Candida antarctica* (CALB, version immobilisée Novozyme 435) est non-spécifique alors que les lipases de *Rhizomucor miehei* (RML, version immobilisée; Lypozyme RM IM) et de *Thermomyces lanuginosus* (TLL, version immobilisée Lypozyme TL IM) sont 1,3-régiospécifiques (Tableau 4). L'utilisation d'enzymes régio-spécifiques pour la transestérification de triglycérides suppose un rendement de conversion théorique de seulement 66%. Il est cependant possible d'obtenir des rendements supérieurs en employant certaines conditions qui favorisent la migration spontanée des chaînes acyles d'une position secondaire à une position primaire. Par exemple, en utilisant un support d'immobilisation polaire (silice), Du et collaborateurs ont réussi à obtenir 90% de conversion contre 66% seulement sans ce support [47]. Alternativement, certains chercheurs proposent l'utilisation des enzymes de chaque catégorie afin d'obtenir un maximum de conversion [48].

Tableau 1.3. Spécificité des lipases commerciales communes. Adapté de [49].

Enzyme commerciale	Source	Spécificité	Compagnie	Application
Novozyme 435	<i>Candida antarctica</i>	non-spécifique	Novozymes	Synthèse organique
Lypozyme IM-60	<i>Rhizomucor miehei</i>	1,3-spécifique	Novozymes	Synthèse organique
Lypozyme TL IM	<i>Thermomyces laguninosus</i>	1,3-spécifique	Novozymes	Synthèse organique
Lypozyme IM-20	<i>Rhizomucor miehei</i>	1,3-spécifique	Novozymes	Détergents
Lipomax	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	non-spécifique	Gist-Brocades	Détergents
Lipase AH	<i>Pseudomonas cepacia</i>	1,3-spécifique	Amano Pharmaceuticals	Synthèse organique
Lipase AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	n/d	Amano Pharmaceuticals	Synthèse organique
Lipase K-10	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	n/d	Biocatalysts	Bio-transformation

De façon générale, les lipases d'origine bactérienne agissent dans un large spectre de pH mais ont une préférence pour les pH autour de 8-9. Elles ont aussi des températures optimales variant entre 30 et 60°C mais certaines enzymes sont psychrophiles ou thermophiles [49]. Les lipases n'ont généralement pas besoin de cofacteurs pour être actives même si certains ions divalents comme le calcium sont reconnus pour stimuler certaines enzymes lipolytiques [50]. Le calcium aiderait à stabiliser l'intégrité structurale des enzymes sans en affecter directement l'activité catalytique [51]. Néanmoins, des études structurales sur deux lipases de la famille 1.3 ont permis d'expliquer pourquoi l'activité de ces deux enzymes dépend exceptionnellement de la présence de calcium. Ces lipases ont la particularité de posséder deux couvercles dont le positionnement dépend de la liaison d'un ou plusieurs ions de calcium afin d'exposer le site catalytique au substrat [52, 53]. D'autres facteurs influencent l'activité des lipases comme la présence de surfactants ou de solvants organiques dans le milieu réactionnel. La présence de ces molécules active souvent les lipases en interagissant avec les résidus hydrophobes de surface. Ceci simulerait le phénomène d'activation interfaciale [35, 54]. Certaines enzymes peuvent présenter plus d'affinité pour des types particuliers de triglycérides

contenant des acides gras saturés ou des longueurs spécifiques de chaînes carbonées. L'affinité des lipases dépend directement de leur structure et doit être déterminée pour chaque enzyme [40].

Tel que mentionné précédemment, la présence d'eau est essentielle pour promouvoir la conformation active de l'enzyme. Cependant, trop d'eau favorise la réaction d'hydrolyse et la libération d'AGLs au détriment de la réaction de synthèse [46]. Plusieurs études ont démontré que l'ajout d'eau augmente les rendements de conversion, mais la concentration doit être optimisée en fonction des propriétés de l'enzyme et des systèmes employés (immobilisée ou libre, type de biomasse, accepteur d'acyle, utilisation de solvants, etc.) [55]. Il est possible d'employer les lipases dans des systèmes de solvants organiques comme les hexanes ou l'éther, mais même dans ces systèmes, l'ajout contrôlé de faibles quantités d'eau (microhydratation) est crucial afin d'obtenir une activité enzymatique optimale [32, 56-58]. Bien des études portent sur les effets de la concentration de l'eau sur l'activité de synthèse des lipases en milieu organique. Il semble cependant que ce paramètre soit inadéquat pour prédire le comportement des enzymes dans ces conditions. Certains auteurs ont souligné que la mesure de l'énergie de l'eau dans un système (dite activité de l'eau ou «water activity»; a_w) était beaucoup plus efficace pour déterminer les conditions optimales d'hydratation des lipases. En effet, ce paramètre tient aussi compte des interactions de l'eau avec les différentes composantes d'un système organique et peut être vulgarisé comme la mesure de l'eau «libre» réellement disponible (<http://www.wateractivity.org/>). Par exemple, en prenant deux solvants organiques de polarité différente, l'éthanol et le pentanol, il est possible de cibler une même activité de l'eau même si cela correspond en réalité à des concentrations finales d'eau totalement différentes. L'éthanol aura tendance à accaparer plus de molécules d'eau que le pentanol et un système concentré en éthanol devra contenir plus d'eau pour obtenir la même pression-vapeur optimale d'eau que celle déterminée pour le pentanol. En modulant ce facteur, il est donc possible de favoriser efficacement une réaction de synthèse par rapport à une réaction d'hydrolyse [33, 56, 57]. Les autres

facteurs d'optimisation des lipases pour effectuer des réactions de synthèse organique sont l'immobilisation des lipases sur différents supports et l'utilisation de solvants organiques. Il n'existe cependant aucune règle générale indiquant quel matériau et condition employer et chaque combinaison doit être évaluée pour chaque lipase ciblée [59]. Il est aussi possible de favoriser une réaction par rapport à une autre via la sélection de donneurs et d'accepteurs d'acyles. Par exemple, la présence d'acétate de vinyle favorise une transestérification rapide et irréversible en produisant un aldéhyde qui ne peut être transformé par l'enzyme [60]. Enfin, de nombreuses études emploient l'évolution dirigée ou encore préconisent une approche rationnelle pour modifier les propriétés d'une enzyme [59, 61]. La littérature regorge d'exemples probants de l'application de telles approches sur les lipases ([62]) et l'analyse de ces études dépasse les objectifs du présent travail. Néanmoins, malgré tous ces succès d'ingénierie des protéines, l'optimisation par génie génétique des lipases reste un processus au cas par cas et il n'existe aucune règle générale garantissant le succès [26].

1.2.6 Les lipases et la biocatalyse industrielle – les limites actuelles

L'utilisation de biocatalyseurs pour la synthèse organique devrait faire appel à des lipases idéalement non régio-spécifiques afin de pouvoir convertir entièrement les tri-, di- et monoglycérides qui composent les principales sources de matière première employées. Ces enzymes devraient aussi être assez flexibles en termes de sélectivité pour permettre l'estérification simultanée des AGLs et l'utilisation de différents accepteurs d'acyles comme des alcools secondaires, voir tertiaires. Aussi, afin de minimiser les temps de production des molécules biosourcées, l'activité enzymatique spécifique devrait être élevée. L'enzyme devrait aussi être réutilisable un maximum de fois ce qui implique une thermostabilité et une résistance aux alcools employés. Enfin, cette enzyme devrait être produite facilement en grande quantité et immobilisée à moindre coût sur un support qui augmente son activité en simulant l'activation interfaciale ou qui la maintient dans une conformation active [29].

L'inactivation des lipases par les alcools primaires à chaîne courte (méthanol, éthanol) constitue l'un des principaux obstacles à la réutilisation des lipases pour effectuer des réactions de synthèse organique [44, 63]. L'inactivation résulterait principalement d'une perturbation de la couche d'hydratation et des interactions ioniques essentielles à la structure de l'enzyme [29, 32, 64]. D'autres chercheurs ont plutôt suggéré que le méthanol agit comme un inhibiteur compétitif au sein du site catalytique des lipases [44]. Shimada et collaborateurs ont contourné ce problème pour la lipase Novozyme 435 en ajoutant le méthanol par étapes afin de garder un ratio molaire de 1:1 ce qui leur a permis de synthétiser du biodiesel pendant plus de 100 cycles (3 mois) sans baisses de rendement [65]. Cependant, bien que prometteuse, cette approche ralentit considérablement le processus de production ce qui est peu souhaitable dans un contexte industriel [66]. Certaines lipases sont naturellement résistantes au méthanol comme la plupart des lipases provenant des *Pseudomonas* et pourraient servir de modèle pour des études de modification rationnelle [67]. Alternativement, il est possible de cribler la diversité microbienne pour trouver des lipases naturellement stables. Récemment, certains chercheurs ont étudié une lipase thermostable et résistante aux alcools primaires capable de synthétiser du biodiesel [68]. Certains chercheurs ont aussi démontré que la simple immobilisation sur un support hydrophobe augmentait sensiblement la résistance des enzymes aux solvants par des mécanismes qu'il reste à élucider [69-71].

La plupart des réactions catalysées par les lipases sont souvent trop lentes par rapport aux procédés chimiques classiques ce qui rend leur utilisation commerciale difficile [14, 72]. Pour améliorer la rapidité de la réaction, il est possible d'augmenter la concentration de biocatalyseur, mais les coûts de production des lipases commerciales les rendent tout simplement trop onéreuses pour une telle approche dans la production d'esters de faible valeur ajoutée comme le biodiesel [6, 73]. De plus, l'utilisation de trop grandes quantités de lipases provoque souvent des problèmes d'émulsion à cause de leur nature amphiphile. D'ailleurs, à ce jour, il n'existe que deux usines pilotes de production de biodiesel par biocatalyse dans le monde (TransBiodiesel en Chine et Piedmont Biofuels aux États-Unis). Les deux usines emploient les enzymes commerciales Lipozyme TM et Novozyme

435 (Novozymes, Danemark). Ces enzymes sont parmi les plus performantes et les plus employées dans la synthèse de biodiesel [74]. Or, le biocatalyseur Novozyme 435 coûte à lui seul plus de 1000 US\$ par kg et son utilisation permet de produire du biodiesel à un coût de transformation au moins 23 fois supérieur en comparaison au coût de production obtenu avec le NaOH [29]. Si l'on ajoute ces coûts à ceux de la biomasse employée, il est évident que le processus est encore loin d'être compétitif par rapport au diesel conventionnel. Les coûts de production des lipases proviennent essentiellement du fait qu'elles doivent passer par des étapes complexes d'expression, de purification et d'immobilisation avant d'être utilisées commercialement [74]. Alors qu'avec la catalyse chimique, environ 70 à 80% des coûts de production sont associés à la biomasse employée, dans le cas de la catalyse enzymatique, les coûts des biocatalyseurs peuvent représenter jusqu'à 90% de ce coût [72, 75]. Nielsen et collaborateurs ont évalué qu'un coût de transformation de 0,025 US\$ par kg de biodiesel produit permettrait d'envisager la production de masse par biocatalyse [76]. Dans le cas de la lipase Novozyme 435, cela reviendrait à un prix de vente avoisinant les 44 US\$/kg, soit une réduction d'au moins 2200% du coût d'achat actuel [29]. Il reste donc encore beaucoup de travaux de recherche à effectuer afin de rendre l'utilisation industrielle des lipases plus compétitive [19, 26].

1.2.7 L'immobilisation artificielle des lipases

Afin de réduire les coûts de production de biomolécules à partir de biocatalyseurs, diverses techniques d'immobilisation sur un support « hétérogène » ont été développées. L'immobilisation permet de réutiliser le catalyseur en plus d'éviter sa contamination dans le produit final. La réutilisation est le facteur primordial dans la réduction des coûts d'utilisation d'enzymes pour la biocatalyse [29]. L'immobilisation permet aussi l'utilisation du catalyseur en mode continu, une étape essentielle pour tout procédé industriel [77]. De plus, de nombreuses études ont démontré les effets bénéfiques de l'immobilisation des enzymes sur leur activité catalytique. L'immobilisation améliore l'activité et la stabilité des enzymes face à la dénaturation par la chaleur, les solvants et

même les variations de pH (Figure 1.8) [70, 78]. L'immobilisation peut aussi améliorer la spécificité et même la stéréosélectivité des lipases [79]. Les principaux désavantages de l'immobilisation sont associés à des changements de conformation des protéines qui peuvent provoquer leur inactivation, voir leur dénaturation. De plus, en fonction du support employé, il n'est pas rare de constater des problèmes de transferts de masse qui réduisent grandement l'activité spécifique des enzymes [77]. En effet, il est fréquent que la porosité et la nature chimique d'un support affectent les vitesses de diffusion des substrats et des produits entre le milieu réactionnel et les enzymes même. Par exemple, la production de biodiesel à l'aide de Novozyme 435 rencontre souvent des diminutions de rendement au fur et à mesure que le glycérol libéré adhère à la surface polaire et poreuse des billes d'acrylique [80].

On peut regrouper l'ensemble des techniques d'immobilisation en fonction du type d'interaction entre l'enzyme et son support. La plupart des techniques font appel soit à des propriétés de rétention physique, soit à diverses stratégies de couplage chimique ou à une combinaison des deux [70]. La rétention physique se fait par l'emprisonnement des enzymes dans une matrice qui peut ou ne pas avoir d'interactions avec l'enzyme. Alternativement, les interactions chimiques des autres techniques reposent sur un échange entre les protéines et le support. Parmi les échanges possibles, il y a les interactions de faible force (ex. force de dispersion, forces de van der Waals), les interactions ioniques (ex. hydrophobicité) et les liens chimiques covalents [81]. Idéalement, le support employé devrait être très poreux afin d'avoir le plus grand ratio surface/volume possible permettant d'immobiliser un maximum d'enzyme. Il devrait aussi être compatible avec les réactifs et les conditions physiques du procédé de synthèse [79]. Il n'existe cependant pas d'approche universelle et l'efficacité de la méthode dépend beaucoup des propriétés des supports et des biocatalyseurs employés [59].

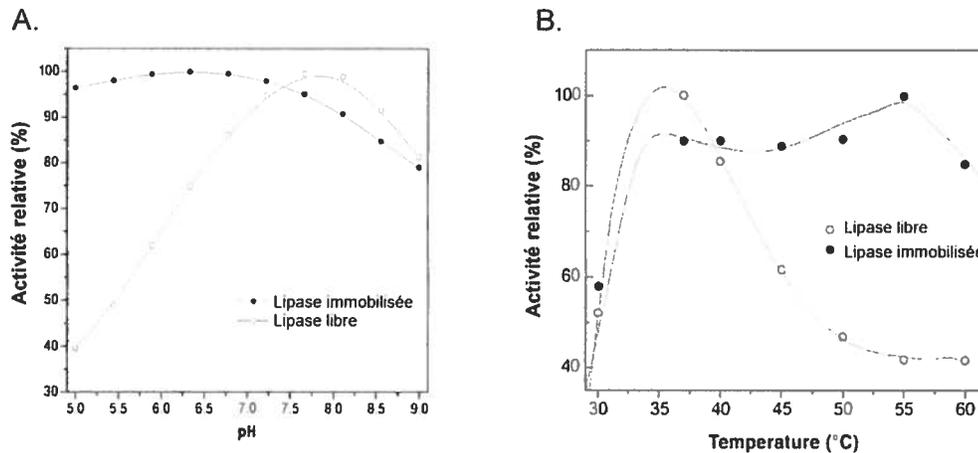


Figure 1.8. Effets de l'immobilisation sur l'activité lipolytique de la lipase de *Candida rugosa* (CRL). A. Activité de l'enzyme en fonction du pH. B. Activité de l'enzyme en fonction de la température. Adapté de [82].

1.2.7.1 L'immobilisation par adsorption

L'adsorption se base sur l'effet de dispersion et les interactions ioniques pour coupler les protéines sur des supports aussi divers que la terre diatomée (silice), des résines ioniques (acrylique, agarose, polystyrène, polypropylène, etc.) ou même des membranes de textiles [55]. L'adsorption de lipases donne de meilleurs résultats avec des matrices hydrophobes en raison de la nature amphiphile des ces dernières [83]. La présence de groupements acyles augmente aussi l'activité des ces enzymes en simulant l'activation interfaciale (Figure 1.9). La plupart du temps, des matériaux poreux sont employés afin d'augmenter la surface d'adhésion et donc le rendement d'immobilisation [84]. Le problème majeur de cette approche est le phénomène de lessivage de l'enzyme surtout dans les milieux aqueux. Le lessivage est cependant moindre dans les milieux organiques car les lipases sont insolubles dans les solvants organiques. La lipase B de *C. antarctica*, l'une des plus employée au monde, est immobilisée de cette façon sur une résine macroporeuse d'acrylique (Novozyme 435) [85]. Néanmoins, plusieurs chercheurs ont noté que ce biocatalyseur industriel souffre tout de même de lessivage ce qui limite sa

réutilisation en plus de créer une contamination du produit par une activité résiduelle [84, 85]. Il reste que cette approche, de par sa simplicité et la disponibilité des matériaux, est la moins chère en coûts d'immobilisation artificielle et n'emploie généralement pas de produits chimiques toxiques ou dommageables pour l'environnement [81].

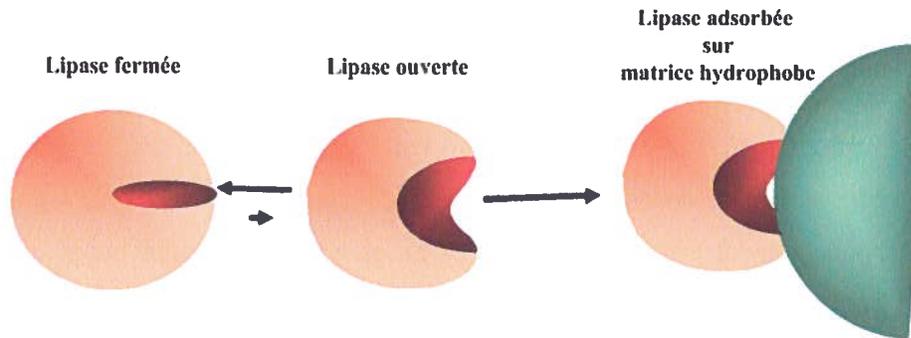


Figure 1.9. Activation interfaciale d'une lipase lors de son adsorption sur support hydrophobe. Adapté de [79].

1.2.7.2 La liaison covalente

La liaison covalente se base sur le couplage chimique irréversible des protéines et offre l'avantage de pouvoir se faire dans des conditions douces (température ambiante, conditions aqueuses). Le glutaraldéhyde est l'agent de couplage le plus utilisé, car il réagit spontanément avec les groupements amines des résidus lysines ou celui de l'extrémité N-terminale des protéines. Ceci permet de les coupler sur un support ayant les mêmes groupements fonctionnels (Figure 1.10-A). Alternativement, cette approche peut être employée pour stabiliser les enzymes immobilisées *via* l'adsorption passive ou carrément pour coupler les enzymes ensemble afin de former des agrégats d'enzymes réticulées (Cross Linked Enzyme Aggregates; CLEA) [86]. En effectuant une étape de précipitation, il est possible de lier les enzymes entre elles pour former des CLEA de tailles variées. Bien que cette technique ait démontré une certaine efficacité vu sa simplicité, la taille relativement petite des agrégats ($\sim 10 \mu\text{m}$) complique le processus de

purification des esters produits et le recyclage du catalyseur [81, 87]. De plus, l'efficacité de couplage avec le glutaraldéhyde dépend beaucoup de la concentration employée et du temps d'exposition ainsi que du pH de la solution. Un pH inférieur à 10.5 ne permet pas d'ioniser les résidus lysines et limite l'ancrage à l'extrémité N-terminale seulement, ce qui peut affecter l'activité de l'enzyme [88]. Des tests empiriques sur l'utilisation du glutaraldéhyde doivent être menés pour chaque enzyme et chaque type de support employé [89]. L'utilisation de glutaraldéhyde à grande échelle se veut aussi un procédé potentiellement toxique et onéreux et ne répond pas vraiment aux principes de la chimie verte. Aussi, l'immobilisation covalente est préférable *via* l'utilisation de polymères activés ayant des groupements réactifs comme des époxydes qui réagissent aussi spontanément avec les groupements amines de surface mais aussi les hydroxyles et les sulfhydryles (Figure 1.10-B) [87, 90]. Ceci permet d'augmenter substantiellement le nombre de liaisons possibles et donc assure une plus grande rigidité et une orientation différente des enzymes liées. Bien qu'efficaces, les coûts d'acquisition ou de synthèse de ces supports de polymères activés augmentent considérablement les coûts d'immobilisation. Enfin, la plus grande difficulté avec l'immobilisation covalente est de contrôler le nombre de points d'ancrages avec le support. Bien que l'augmentation de la rigidité des enzymes améliore leur résistance à la dénaturation, une trop grande rigidité peut affecter la spécificité voir détruire l'activité enzymatique [79]. De plus, il faut s'assurer de l'orientation de la protéine par rapport au support afin d'éviter la formation spontanée de liens dans des endroits critiques tels que le site actif. L'ingénierie des protéines peut toutefois aider à mieux contrôler l'orientation, le nombre et le type de liaisons covalentes avec le support sélectionné [70, 77]. Par exemple, les résidus lysine proches du site actif de la lipase TLL ont tous été mutés hormis un seul résidu de surface situé à l'opposé du site actif. Cela a permis d'orienter l'enzyme avec le site actif tourné vers le milieu réactionnel et une plus grande activité a été observée par rapport à l'immobilisation de l'enzyme sauvage [70].

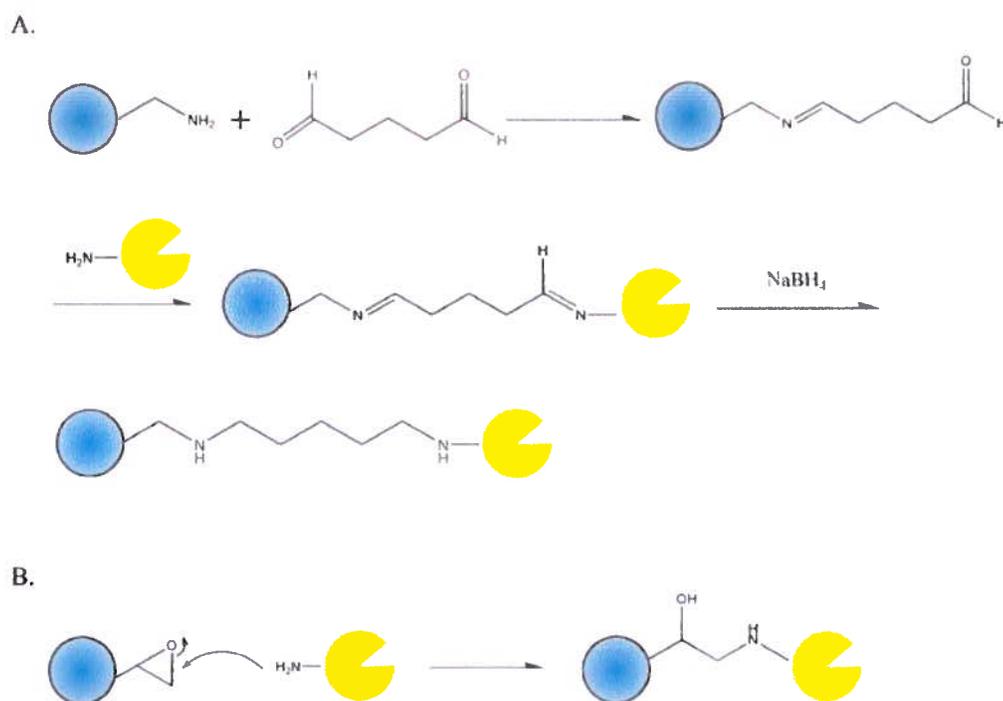


Figure 1.10. Schématisation de liaisons covalentes entre une lipase et un support artificiel. A. Liaison covalente entre un support aminé et une enzyme (en jaune) en présence de glutaraldéhyde. B. Liaison covalente entre un support époxyde et une enzyme. Adapté de [70].

1.2.7.3 L'enrobage des enzymes

L'enrobage d'enzymes est une technique qui permet de protéger physiquement les protéines des contraintes du milieu réactionnel (pressions, solvants, cisaillements mécaniques, etc.). L'enrobage peut se faire par emprisonnement ou par encapsulation des enzymes dans une matrice de polymère. Les polymères employés sont très variés et vont des alginates de sodium aux polymères de silice. Le processus est relativement simple et se fait dans des conditions douces, souvent à température ambiante [82]. L'une des techniques les plus efficaces consiste à polymériser une matrice de silice autour de l'enzyme solubilisée dans les précurseurs du polymère, le plus souvent des dérivés alkyles de silanes (ex. tetraméthoxysilane, TMOS) [71]. En présence d'un catalyseur

acide, comme le fluorure de sodium (NaF), les précurseurs se polymérisent en une sorte de gel hydraté poreux qui emprisonne l'enzyme dans une matrice appelée « sol-gel ». Cette matrice est formée de silice poreuse remplie d'eau et de méthanol produits lors de la polymérisation (Figure 1.11-A). L'évaporation lente du contenu en eau et en alcool provoque une contraction du gel qui devient plus cristallin et moins poreux pour devenir un xérogel beaucoup plus dur (Figure 1.11-B). Alternativement, il est possible de substituer l'eau par de l'acétone et par la suite enlever l'acétone par du dioxyde de carbone (CO₂) supercritique afin de former un aérogel beaucoup plus poreux. L'aérogel est la forme déshydratée mais non-contractée du sol-gel [91].

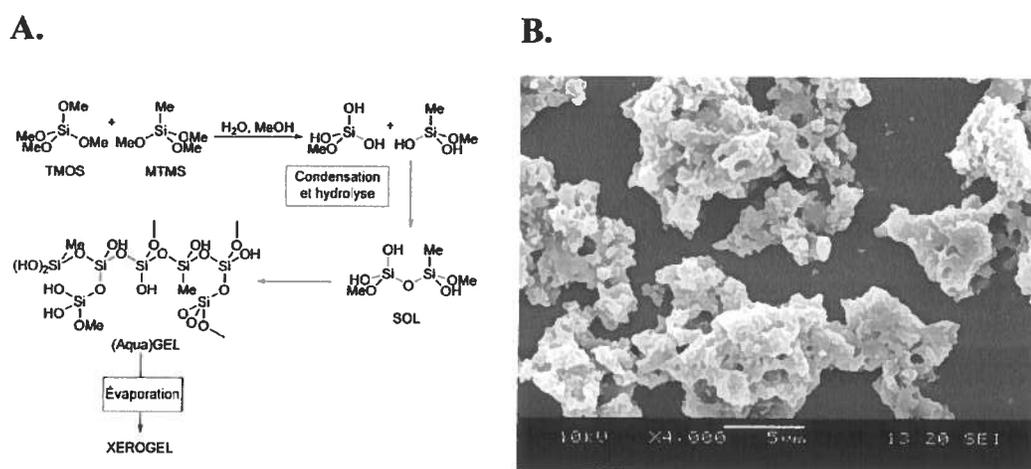


Figure 1.11. Réaction de polymérisation d'un sol-gel. A. Schématisation de la réaction de synthèse d'un sol-gel (adapté de [70]). B. Image de particules de xérogel obtenues par microscopie par balayage électronique (source [92]).

L'emprisonnement dans un sol-gel hydrophobe augmente drastiquement l'activité enzymatique (jusqu'à 8800% par rapport à la forme libre), la résistance à la dénaturation thermique et au pH [93]. La raison exacte de ces effets n'a pas encore été déterminée, mais le fait de confiner physiquement l'enzyme dans une matrice solide pourrait limiter sa flexibilité ce qui permettrait de conserver sa conformation active. De plus, l'utilisation de précurseurs ayant des chaînes hydrophobes (ex. *n*-butyltriméthoxysilane, BTMS) serait probablement à l'origine de l'augmentation de l'activité enzymatique observée en simulant l'activation interfaciale [82, 93]. Hsu et collaborateurs ont réussi à obtenir un

taux de production de biodiesel de 70-100% en 48h avec la lipase de *T. lanuginosa* immobilisée en sol-gel TMOS [94]. Ils ont toutefois «dopés» l'immobilisation en ajoutant de l'argile phyllosilicate pour adsorber la lipase. L'ajout d'additifs dopants comme du polyéthylène glycol (PEG) ou de l'alcool polyvinylique (PVA) augmente l'activité des lipases immobilisées. Les additifs protégeraient les lipases de la dénaturation par l'alcool produit lors de la synthèse du sol-gel et participeraient au maintien de la conformation active durant l'étape de déshydratation en xérogel [95].

À ce jour, l'emprisonnement constitue le meilleur moyen d'éviter les impacts négatifs des milieux réactionnels sur la structure des enzymes [96]. La simplicité du processus et les conditions douces associées en font aussi un procédé commercialement intéressant même si le coût des précurseurs s'ajoute à celui des enzymes à immobiliser. Néanmoins, ce type de polymère n'est que peu employé par l'industrie. Des problèmes de transfert de masse dans les pores étroits des xérogels limitent leur efficacité pour la synthèse d'esters. La concentration des précurseurs et l'ajout d'additifs stimulant les lipases doit aussi être déterminée empiriquement pour chaque enzyme. Enfin, les précurseurs des sol-gel de silice sont relativement onéreux et sont très toxiques.

1.2.7.4 La problématique de l'immobilisation artificielle

Bien que plusieurs de ces techniques semblent très prometteuses pour l'immobilisation de lipases commerciales, très peu sont actuellement employées en dehors du cadre expérimental. Les applications industrielles issues de ces biocatalyseurs immobilisés sont encore limitées uniquement à la production de molécules à très haute valeur ajoutée. En effet, toutes ces techniques d'immobilisation supposent des étapes préalables de production extracellulaire sous forme soluble des enzymes. Or, même si ce type d'expression recombinante est relativement simple et efficace, ces modèles impliquent souvent des étapes subséquentes de purification et/ou de concentration des enzymes avant d'envisager toute immobilisation. Les meilleurs systèmes d'expression extracellulaires ne peuvent produire plus de quelques grammes de protéine sécrétée par

litre de fermentation [97-99]. Bien que très acceptables, ces rendements ne sont pas assez importants pour l'utilisation de masse des enzymes et font des protéines recombinantes des produits onéreux *de facto*. De plus, il est souvent essentiel de purifier les protéines recombinantes afin d'améliorer l'activité spécifique des enzymes immobilisées en éliminant toutes les protéines «contaminantes». D'ailleurs, la purification d'enzymes recombinantes est l'un des principaux facteurs qui empêche leur utilisation pour la production biocatalytique de molécules biosourcées à très grande échelle [29, 72, 87]. Quant à la production intracellulaire des enzymes, la récupération des protéines recombinantes implique une lyse cellulaire, un processus difficilement viable à grande échelle sauf si la protéine a en soi une haute valeur ajoutée comme dans le cas de la production d'insuline humaine [100]. Les étapes laborieuses et complexes de la production des enzymes additionnées à leur immobilisation les rendent tout simplement déjà trop onéreuses pour la production de masse de molécules de faible valeur ajoutée comme les biocarburants, les polyesters voir les arômes et fragrances [101].

1.2.8. L'immobilisation à l'aide de supports biologiques

L'utilisation de cellules entières (WCB pour Whole Cell Biocatalyst) pour la synthèse de composés industriels d'intérêt existe depuis longtemps. La production d'éthanol par fermentation peu être considérée comme une biosynthèse par des cellules entières en milieu organique [102]. Néanmoins, la plupart des molécules d'intérêt industriel ont une inhérente toxicité pour les cellules vivantes due à leur capacité à perturber l'intégrité des membranes plasmiques [102]. Ainsi, ces molécules ne peuvent être produites qu'à des concentrations relativement faibles ce qui augmente leur coût de production. L'avènement de systèmes abiotiques basés sur l'exploitation de préparations enzymatiques permet de contrer en partie ce problème. Ce concept a été étendu aux WCB qui deviennent des supports pour les enzymes. Les cellules mortes sont employées comme des «sacs remplis d'enzymes» afin de réduire les coûts et de simplifier la récupération des biocatalyseurs [103]. Cette approche simplifie aussi grandement les

étapes de production du catalyseur en se limitant à la culture des organismes producteurs d'enzymes. La culture de ces micro-organismes est peu onéreuse comparativement à la production, la purification et l'immobilisation d'enzymes recombinantes. Il suffit de simplement récupérer la biomasse une fois la culture microbienne terminée et de l'employer afin de faire des réactions de synthèse. L'environnement de la cellule protège physiquement les enzymes comme une capsule et réduit grandement leur dénaturation. L'utilisation commerciale de cellules entières a même été appliquée à des systèmes multienzymatiques complexes avec régénération de cofacteurs comme le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP/NADPH) [104]. Les inconvénients de cette approche sont des problèmes de transfert de masse et la conservation de l'intégrité cellulaire dans les conditions de production industrielle, à savoir d'importantes forces de cisaillement, des températures généralement élevées et l'utilisation de solvants organiques. L'utilisation de WCB se fait principalement de deux façons: l'expression intracellulaire et l'expression de surface.

1.2.8.1 L'utilisation d'enzymes intracellulaires

L'expression intracellulaire de lipases peut se faire *via* la culture d'organismes naturellement lipolytiques ou bien en employant des systèmes recombinants de surexpression de gènes hétérologues. Divers systèmes recombinants ont été testés avec succès en particulier chez *E. coli* [105-109]. D'autres systèmes basés sur l'expression eucaryote ont été développés chez les levures *S. cerevisiae* [110] et *P. pastoris* [111] et chez les hyphomycètes [112]. Les cellules peuvent être employées sous forme hydratée ou bien lyophilisée [106]. Par contre, les cellules doivent souvent être perméabilisées afin de réduire la barrière de diffusion exercée par les membranes plasmiques envers certains composés, surtout les composés hydrophobes [106, 110, 113]. Les agents perméabilisant employés sont généralement des surfactants comme le Tween, le Triton ou des solvants organiques polaires comme l'acétone et l'isopropanol [103]. Cette étape implique simplement d'incuber les cellules avec l'agent perméabilisant avant la lyophilisation ou

l'utilisation du WCB. Les perturbations induites par ces composés au niveau des membranes plasmiques seraient suffisantes pour améliorer les vitesses de diffusion de divers composés hydrophobes. Wei et collaborateurs ont observé une augmentation du niveau de synthèse du biodiesel de 45% à plus de 95% suite à un traitement au bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), un surfactant cationique. Ils ont aussi remarqué que l'enzyme immobilisée était remarquablement résistante à la dénaturation au méthanol, probablement grâce à l'effet protecteur des cellules [106]. Ce type de biocatalyseur a été employé avec succès pour la production de biodiesel [105, 107, 111], la résolution chirale d'alcools comme le D,L-menthol [109] et l'acétylation régio-spécifique de dérivés de cytidine (un composé antitumoral) [114].

D'autres systèmes ont été développés afin d'exploiter les avantages d'hyphomycètes naturellement lipolytiques. Ces mycètes possèdent en effet une croissance hyphale qui permet la colonisation des supports inertes comme des billes de polystyrène (BSP pour « Biomass Support Particle ») (Figure 1.12). La culture du champignon *Rhizopus oryzae* sur de telles particules a permis la conversion d'huile végétale à 90% en esters de méthyle à très faibles coûts [115]. Les souches naturelles cultivées en présence d'huile d'olive surexprimaient naturellement la lipase de *R. oryzae* (ROL) sous forme intracellulaire [116]. La perméabilisation avec ce système s'est avérée étonnamment non-essentielle. De plus, les taux de conversion avec les cellules entières étaient beaucoup plus élevés comparativement à ceux obtenus avec la même lipase sous forme libre probablement à cause de l'effet protecteur des cellules sur les enzymes [117]. Néanmoins, même si les cellules immobilisées sur des BSP ont pu être réutilisées à plusieurs reprises, une baisse d'activité substantielle a été observée entre les essais. Cette baisse a été attribuée principalement à l'effet dénaturant du méthanol sur les enzymes. Pour contrer ce phénomène, les cellules ont été fixées au glutaraldéhyde ce qui a permis d'augmenter significativement leur réutilisation [118]. Fukuda et collaborateurs ont poussé l'exploit jusqu'à synthétiser du biodiesel à partir d'un bioréacteur à lit fixe rempli de BSP de *R. oryzae* [119]. Ils ont obtenu un rendement de conversion supérieur à 90% avec un débit

de 25L/h et ont pu réutiliser les BSP plus de dix fois avec un taux de conversion final de 80%. Néanmoins, l'utilisation de débits plus élevés provoquait l'exfoliation des cellules et l'utilisation de BSP s'est avérée inadéquate pour une production en cuvée, une méthode courante dans l'industrie. Les forces de cisaillement induites par l'agitation détruisaient les BSP trop fragiles pour ce type de réacteur. Bien que très prometteuse, les rendements de conversion et les temps réactionnels de cette approche ont souvent été inadéquats pour des applications industrielles à cause de problèmes intrinsèques de transfert de masse au travers des membranes plasmiques [120]. Une accumulation des produits réactionnels (esters de méthyle et glycérol) à l'intérieur des cellules a été identifiée comme principal facteur ralentissant les taux de conversion de la biomasse [58]. Il semble que les produits réactionnels n'arrivaient pas à diffuser au dehors des cellules une fois la réaction complétée. Néanmoins, cette approche simple démontre qu'il est possible d'employer des WCB à faibles coûts pour la production d'esters carboxyliques.

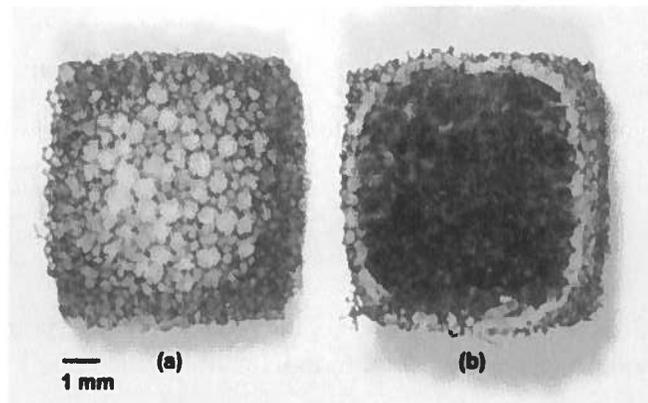


Figure 1.12. Micrographie de supports de biomasse (BSP) colonisés par *Rhizopus oryzae*. A) Coupe transversale. B) Vue latérale. Source [115].

1.2.8.2 L'expression de surface

L'expression de surface de protéines recombinantes est une approche puissante employée dans plusieurs domaines aussi variés que le criblage fonctionnel de bibliothèques combinatoires, la présentation d'antigènes pour la fabrication de vaccins, la

bioremédiation de zones contaminées et la production de molécules pharmaceutiques [121]. Le principe consiste à utiliser le génie génétique pour créer un lien covalent entre les enzymes et la surface des cellules (Figure 1.13). Différentes constructions entre des gènes codant pour enzymes d'intérêt et des protéines d'ancrages membranaires ont permis d'exprimer efficacement des protéines de fusion à la surface de plusieurs types de cellules. Des systèmes d'expression de surfaces ont été développés pour les phages, les bactéries Gram(+) et Gram(-) et les cellules eucaryotes, en particulier les levures [122-124].

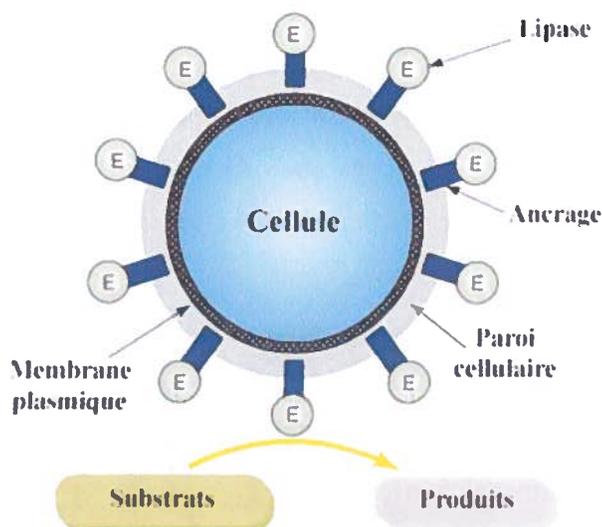


Figure 1.13. Schématisation d'une cellule recombinante exprimant une lipase à sa surface. Dans ce modèle, la cellule peut être une levure ou bien une bactérie Gram(+). Adapté de [120]

Peu d'études rapportent cependant l'expression de surface d'enzymes lipolytiques chez *E. coli*. Les protéines d'ancrage employées peuvent être homologues à *E. coli* (FadL, INP) ou bien hétérologues comme la protéine de surface OprF de *Pseudomonas aeruginosa* et la protéine PgsA de *Bacillus subtilis* [125-128]. L'immobilisation de surface de lipases hétérologues procaryotes a permis d'augmenter considérablement la thermostabilité des enzymes mais aussi leur énantiosélectivité [126, 127]. Néanmoins, la surproduction de protéines de surface semble constituer un stress significatif pour les

cellules et les rendements d'immobilisation restent relativement faibles [129]. Il est possible que l'engorgement des systèmes de transport actif des protéines vers l'extérieur des cellules soit un facteur limitant [124]. Toutefois, des systèmes d'ancrages basés sur des protéines dites «auto-présentatrices» (auto-display) semblent prometteurs. La séquence de ces gènes contient tout ce qu'il faut pour la translocation, le clivage et l'ancrage de la protéine à la surface des cellules [124]. Plusieurs enzymes lipolytiques ont été immobilisées avec succès chez *E. coli* en utilisant la protéine auto-présentatrice EstA de *P. aeruginosa* comme partenaire de fusion [130]. Enfin, il arrive que l'intégrité structurale des membranes externes soit mise en cause par certaines conditions de synthèse organique (ex. toluène, *n*-hexane). Dans cette perspective, un système d'expression de surface employant des cellules de *P. putida* GM730 résistantes aux solvants a été utilisé pour exprimer une lipase thermorésistante de *P. fluorescens* [131].

L'expression de surface de lipases chez les levures permet d'exprimer des protéines qui peuvent avoir besoin de modifications post-traductionnelles pour être actives comme la glycosylation ou la dimérisation. L'immobilisation chez *S. cerevisiae* et *P. pastoris* a été accomplie principalement *via* des peptides d'ancrages basés sur la portion C-terminale de l' α -agglutinine (Aga1) ou le domaine N-terminal de la flocculine (Flo1p) de *S. cerevisiae* [122]. L'efficacité d'expression varie d'une construction à l'autre mais avoisine les 10^4 - 10^5 molécules par cellule [132]. Cette quantité peut toutefois être améliorée en incorporant plusieurs copies du gène de fusion dans les souches recombinantes [133]. Kondo et collaborateurs ont appliqué la fusion de la lipase ROL avec le domaine d'ancrage de Flo1p et exprimé la construction chez *S. cerevisiae* [134]. Cette expression de surface a permis d'obtenir des taux de synthèse de biodiesel comparables à ceux obtenus suite à l'immobilisation intracellulaire de la ROL chez *R. oryzae* mais en 2,5 fois moins de temps [122]. Cette amélioration de l'activité de synthèse serait due à une réduction des limites de diffusion observées avec les systèmes d'immobilisation intracellulaire. L'expression de surface a aussi démontré une meilleure thermostabilité et de meilleurs taux de conversion comparativement à l'utilisation de la

forme libre de lipases [135]. Des cellules lyophilisées de *S. cerevisiae* exhibant la lipase CALB ont pu être réutilisées plus de dix fois pour produire de l'hexanoate d'éthyle (un arôme important) sans perte d'activité significative, démontrant ainsi une remarquable résistance à la dénaturation par les alcools [136].

L'efficacité d'immobilisation à la surface de levures varie grandement d'une espèce à l'autre. L'immobilisation de CALB chez *S. cerevisiae* a démontré une activité spécifique de 25 U/g comparativement à plus de 200 U/g chez *P. pastoris* et ce avec le même ancrage Aga1 [137]. De plus, l'expression de surface chez une même espèce pouvait varier en fonction du type d'ancrage avec 90% de synthèse d'hexanoate d'éthyle en 1,5 h pour CALB-Aga1 et plus de 6 h pour la fusion CALB-Flo1p [137]. Il a été aussi démontré que l'ajout d'un espaceur ainsi que le choix de prendre un partenaire de fusion pour l'extrémité N- ou C-terminale (à savoir Aga1 ou Flo1p) peuvent grandement affecter l'activité de la protéine passagère [134, 136]. La combinaison de ces facteurs peut donc avoir d'énormes impacts sur l'activité lipolytique observée et doit être optimisée pour chaque lipase. L'autre problème majeur semble être associé à la polarité de la surface des cellules qui affecterait l'efficacité des lipases immobilisées. Kondo et collaborateurs ont découvert que le traitement des levures avec des surfactants augmentait de huit fois l'activité spécifique. Les cellules traitées avaient une plus grande hydrophobicité que les cellules contrôle ce qui améliorerait leur dispersion dans les milieux organiques en plus d'augmenter le phénomène d'activation interfaciale des lipases exprimées [138].

1.3. La découverte de nouvelles lipases

1.3.1 Le criblage génomique

Avec les développements de la bioinformatique et du séquençage à haut débit, plusieurs techniques ont été développées afin de chercher des gènes codant pour des

enzymes ayant un potentiel industriel. Les industries recherchent des enzymes qui allient une combinaison optimale de spécificité, de thermostabilité et de résistance aux pH afin de pouvoir répondre aux différentes applications commerciales [59, 139, 140]. L'une des approches les plus simples consiste à cribler les banques d'informations qui découlent des différents projets de séquençage. L'annotation d'un génome constitue une mine d'or pour les chercheurs qui peuvent écrier de ces colossaux fichiers de données les séquences génétiques correspondantes aux protéines ciblées. Sachant que les lipases sont ubiquitaires à toute forme de vie connue, il est relativement aisé de trouver dans ces banques de nouvelles séquences génétiques à caractériser. L'étape suivante consiste à amplifier ces gènes présumés à partir d'amorces dégénérées de séquences connues par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amplicons sont ensuite clonés dans différents systèmes d'expression hétérologues afin d'assurer une expression stable et abondante de la protéine codée. La sélection du système se base sur certains critères comme le pourcentage de bases guanine et cytosine (% G+C) et l'usage des codons. Il suffit ensuite de procéder à l'analyse biochimique des protéines recombinantes. De telles approches ont récemment été appliquées avec succès pour la production de métabolites secondaires, mais aussi pour l'identification de nouvelles lipases et de pectinases [141-143]. Il est clair que ce ne sont pas tous les gènes identifiés qui auront l'activité enzymatique souhaitée. Le degré de succès d'identification de nouvelles lipases dépend du niveau de conservation des séquences choisies pour cribler les génomes, du système d'expression recombinante employé ainsi que des tests de criblage fonctionnel appliqués aux clones produits. Chacune de ces étapes peut «laisser filer» des gènes et des protéines qui pourraient avoir un potentiel fort intéressant.

1.3.2 La métagénomique

La métagénomique a émergé vers la fin des années 1990 avec les progrès du séquençage à haut débit. Elle correspond à l'étude fonctionnelle de l'ensemble de la diversité génétique d'un échantillon biologique [144, 145]. La diversité microbienne au sein d'un biotope comme le sol est immense et découle de plus de 3.5 milliards d'années d'évolution. Même des écosystèmes pauvres en terme d'espèces microbiennes peuvent contenir une fabuleuse diversité génétique au sein des quelques souches présentes. Il est généralement admis que moins de 1% des organismes présents dans l'environnement sont cultivables, ce qui limite grandement l'accessibilité à cette diversité [145]. Avec la métagénomique, cette contrainte est contournée par l'étude systématique de l'ensemble du patrimoine génétique contenu dans un échantillon environnemental.

La métagénomique implique d'extraire tout l'ADN d'un consortium bactérien provenant d'un échantillon environnemental. L'ADN est découpé en fragments relativement longs (typiquement de 5 à 40 kpb) qui sont ensuite clonés dans un vecteur. Les constructions génétiques sont introduites dans un hôte hétérologue afin d'exprimer les gènes contenus dans les fragments. Le choix de l'hôte peut s'avérer crucial afin d'optimiser l'expression recombinante. L'hôte le plus employé reste de loin *E. coli* étant donné l'efficacité des outils de clonage et les techniques de criblage à haut débit disponibles [146]. Néanmoins, pour certaines banques ciblant l'expression de gènes riches en bases G+C ou bien pour l'identification de voies métaboliques complètes, il peut être judicieux de choisir d'autres hôtes hétérologues qui possèdent une machinerie cellulaire mieux adaptée comme les bactéries du genre *Streptomyces* et *Bacillus* [147].

La librairie construite peut être criblée à haut débit par analyse fonctionnelle ou carrément par séquençage dans son ensemble (Figure 1.14). Le criblage fonctionnel augmente les chances d'identifier des gènes codant pour une activité particulière mais qui ne possèderaient pas d'homologie de séquence avec les banques existantes [148]. Les clones présentant une activité positive sont ensuite isolés et la séquence du fragment est

analysée afin d'en déterminer les gènes présumés. Cette analyse peut se faire par un séquençage entier du fragment ou bien par une digestion subséquente du fragment suivie d'un sous-clonage et d'une seconde ronde de criblage fonctionnel afin d'isoler de petits fragments (ex. de 1 à 5 kpb) contenant le(s) gène(s) d'intérêt [147].

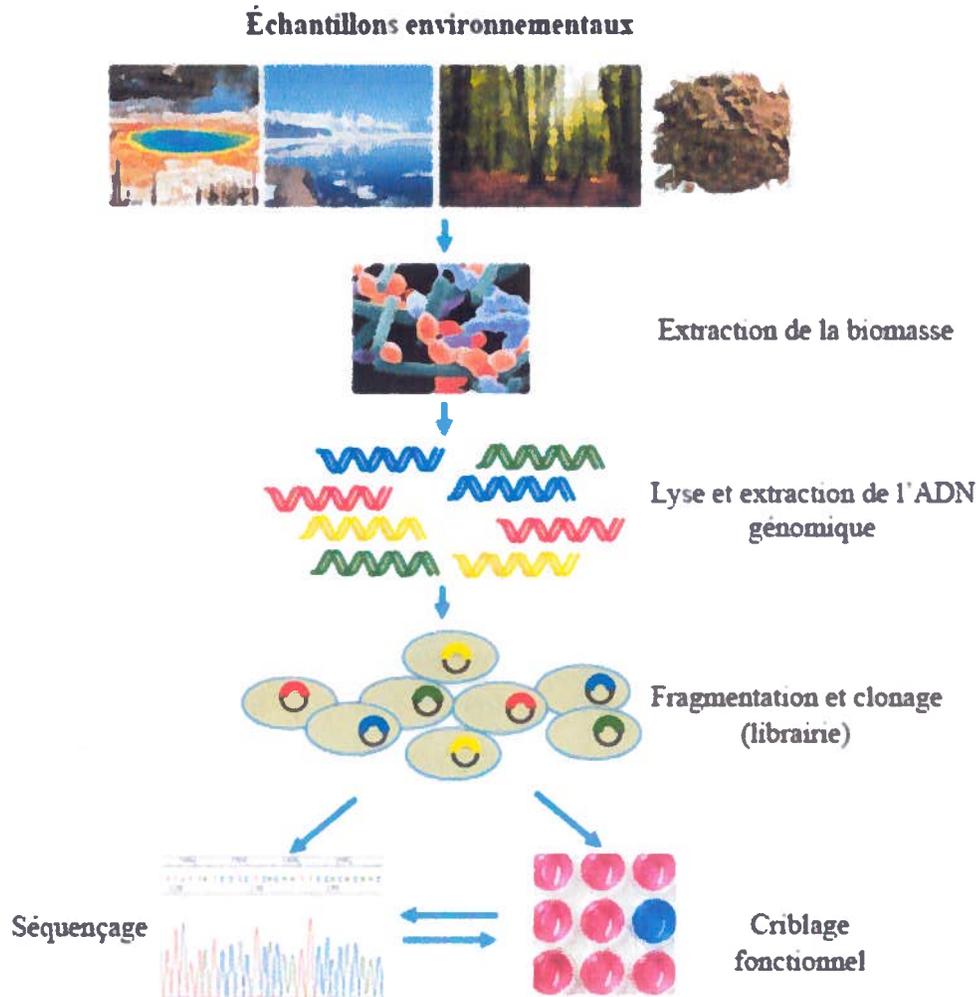


Figure 1.14. Étapes générales d'une étude métagénomique. Adapté de [148].

L'efficacité d'identification de gènes codant pour les activités d'intérêt dépend de la fréquence des organismes qui possèdent l'activité en question dans l'échantillon environnemental ainsi que de la technique de criblage [149]. L'ADN source employé

pour former la librairie génomique peut provenir de milieux naturellement enrichis en organismes possédant l'activité enzymatique ciblée. Par exemple, il est normal de trouver une haute fréquence de gènes codant pour des enzymes lipolytiques dans la biomasse extraite d'un sol contaminé avec des graisses et des huiles [150]. Alternativement, il est possible de retrouver la même activité en criblant un échantillon provenant d'un environnement naturellement très riche en diversité microbienne comme le sol ou un sédiment marin [145]. Enfin, il est possible de cibler des environnements extrêmes où la diversité biologique est moindre mais où la probabilité de trouver des gènes codant pour des protéines aux propriétés uniques est très élevée. Par exemple, plusieurs études faites à partir de consortiums provenant de sources thermales ont permis d'identifier des enzymes (hyper)thermophiles [151-153]. Alternativement, de nombreuses nouvelles enzymes psychrophiles ont été identifiées à partir d'échantillons prélevés en Arctique et en Antarctique [154-156].

Il peut parfois être nécessaire d'enrichir la biomasse en employant une pression sélective qui favorisera la représentativité d'organismes possédant des gènes d'intérêt. L'enrichissement d'un consortium bactérien peut se faire *via* des fluctuations artificielles de pH, de température ou même de sources de carbone [157-159]. Ainsi, l'enrichissement de biomasse est un moyen de contrer les limites de la métagénomique en augmentant substantiellement la fréquence des organismes ayant une activité ciblée. Une telle approche a permis d'identifier des lipases avec des propriétés intéressantes comme une résistance à l'alcalinité [160], une excellente thermostabilité [161] ou bien une halotolérance [150].

L'utilisation de la métagénomique pour identifier de nouvelles enzymes d'intérêt industriel est très efficace. La littérature portant sur la découverte de ces enzymes provenant de toutes sortes de biomasse est abondante. La recherche d'enzymes lipolytiques s'est avérée particulièrement fertile, surtout avec l'approche de l'enrichissement [160, 162]. De toutes nouvelles enzymes aux séquences et propriétés

uniques ont été découvertes (Tableau 1.4). Néanmoins, avant d'envisager leur utilisation industrielle, la caractérisation biochimique complète de ces nombreuses enzymes doit être accomplie et le développement de systèmes de surexpression efficaces et économiques doit être envisagé [163].

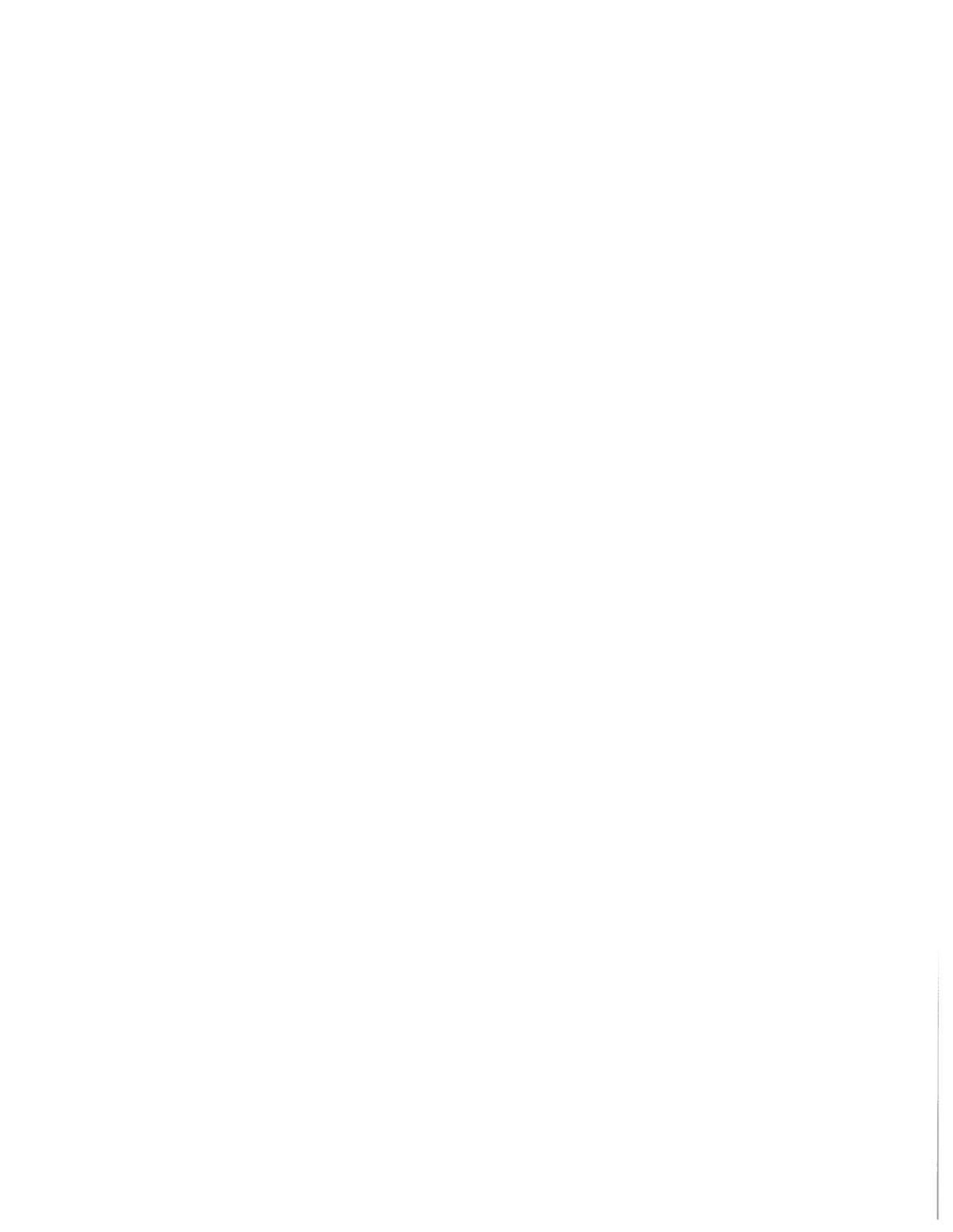


Tableau 1.4. Exemples de nouvelles enzymes lipolytiques découvertes à partir d'études métagénomiques.

Enzyme	Nom	Propriétés/Applications	Hôte d'expression	Source	Référence
Lipase	Metalip1	Résistance aux solvants, surexprimée	<i>E. coli</i>	Boues activées	[164]
	SMLipB, SMLipD	Résistance aux solvants	<i>E. coli</i>	Sol	[165]
	LipZ01	Thermostable, 92% de biodiesel en 12h	<i>P. pastoris</i>	Sol contaminé	[166]
	LipZ03	74% de biodiesel en 36h	<i>P. pastoris</i>	Sol contaminé	[167]
	SMLipA	Résistance aux solvants (50% (v/v) d'isopropanol)	<i>E. coli</i>	Sol	[168]
	MPlaG	Psychrophile, bi-fonctionnelle (lipase et phospholipase)	<i>E. coli</i>	Sédiments intertidaux	[169]
	Lpc53e1	Halo-tolérante	<i>E. coli</i>	Éponge marine	[170]
	LipF5-11	Thermostable (50-60°C, 2h)	<i>E. coli</i>	Fermenteur enrichi	
	Lip1, Lip2	Acidophiles	<i>E. coli</i>	Réservoir d'une plante carnivore	[171]
	LipIAF1-6	Thermostable, résistance aux solvants	<i>S. lividans</i>	Fermenteur enrichi	[162]
	LipIAF5-2	Thermostable, tolérance aux pH alcalins, résistance aux solvants	<i>S. lividans</i>	Fermenteur enrichi	[160]
	RlipE1, RlipE2	Thermolabiles, spécifiques aux longues chaînes acyles	<i>E. coli</i>	Rumen de vache	[172]

Tableau 1.4 (suite).

Enzyme	Nom	Propriétés/Applications	Hôte d'expression	Source	Référence
Estérase	Est-XG2	Thermophile (70°C), spécifique aux alcools tertiaires	<i>E. coli</i>	Boues activées	[173]
	EstEP16	Thermostable (90°C, 6h)	<i>E. coli</i>	Sédiments marins de fumeroles	[174]
	RBest1	Halotolérance, résistance aux solvants	<i>E. coli</i>	Sol forestier	[175]
	EstGX1	Psychrophile	<i>E. coli</i>	Sol forestier des Andes	[176]
	Sys410	Thermostable, spécifique aux pyrethroïdes	<i>E. coli</i>	Sol	[177]
	EstDL6, EstDL136	Hydrolyse l'acétate de chloramphénicol	<i>E. coli</i>	Sédiments alluviaux	[178]
	EstI3	Inhibe la coagulation sanguine	<i>E. coli</i>	Estomac de vers de terre	[179]
	EstPS2	Acidophile	<i>E. coli</i>	Tourbière thaïlandaise	[180]
	EstAT1, EstAT11	Psychrophile, résolution chirale	<i>E. coli</i>	Sédiments côtiers de l'Arctique	[181]
	Lipo1	Psychrophile (optima 10°C)	<i>E. coli</i>	Boues activées	[155]

1.4. Les streptomycètes

1.4.1 Les streptomycètes, des organismes versatiles

Les streptomycètes sont des bactéries Gram(+) saprophytes, filamenteuses et non-pathogènes qui colonisent principalement les sols. Appartenant au phylum des actinomycètes, ce sont des micro-organismes possédant un cycle de vie complexe semblable à celui des mycètes filamenteux (hyphomycètes). Les deux genres ont d'ailleurs en commun une phase de croissance asexuée caractérisée par des hyphes ramifiés qui forment un mycélium primaire en plus de se disperser à l'aide de spores qui émergent de structures aériennes reproductrices [182]. Chez les streptomycètes, la phase reproductrice de sporulation survient lorsque les nutriments viennent à manquer dans le milieu de colonisation [183].

De par leur adaptation à ces niches particulières, les streptomycètes sont reconnues pour produire et sécréter une panoplie d'enzymes afin de pouvoir tirer avantage des différentes sources de nutriments [184]. L'analyse du génome de l'organisme représentatif du genre, *Streptomyces coelicolor* A3(2), montre d'ailleurs que 819 des 7825 gènes provisionnels coderaient pour des enzymes sécrétées [184, 185]. Les streptomycètes possèdent aussi des avantages compétitifs associés à un cycle de vie différencié comme la production de métabolites secondaires tels que des antibiotiques [183]. Ces bactéries sont d'ailleurs la source naturelle de plus de 60% des antibiotiques cliniques connus. Les trois espèces de streptomycètes séquencées à ce jour possèdent des génomes parmi les plus volumineux du règne procaryote (8.7 million de paires de bases (Mpb) pour *S. coelicolor*, 9 Mpb pour *S. avermitilis* et 10.1 Mpb pour *S. scabies*). La diversité génétique des streptomycètes est donc immense et il est vraisemblable de croire que leur potentiel biocatalytique en est représentatif [27].

1.4.2 L'accumulation de lipides de réserve chez les streptomycètes

Des études ont démontré que les streptomycètes sont capables d'accumuler d'importantes quantités cytoplasmiques de lipides neutres (triacylglycérides, TAGs) sous forme de granules cytoplasmiques entourées d'une monocouche lipidique (Figure 1.15). La présence de triglycérides cytoplasmiques est une caractéristique rare parmi les procaryotes quoique relativement courante chez les actinomycètes [186-188]. La plupart des procaryotes qui accumulent d'importantes quantités de lipides de réserve le font généralement sous forme de polyhydroxyalcanoates (PHAs) et parfois d'esters de cires [186]. Or, ces composés n'ont pas été détectés chez les streptomycètes analysés à ce jour. Il a été longtemps suggéré que l'accumulation cytoplasmique de TAGs durant la phase stationnaire de culture chez les streptomycètes pourrait servir de source de carbone pour la production d'antibiotiques comme les polycétides [188, 189]. Néanmoins, des études récentes avec des mutants de la voie de synthèse des TAGs chez *S. coelicolor* tendent à invalider cette hypothèse et à suggérer plutôt un simple rôle de réserve énergétique [187].

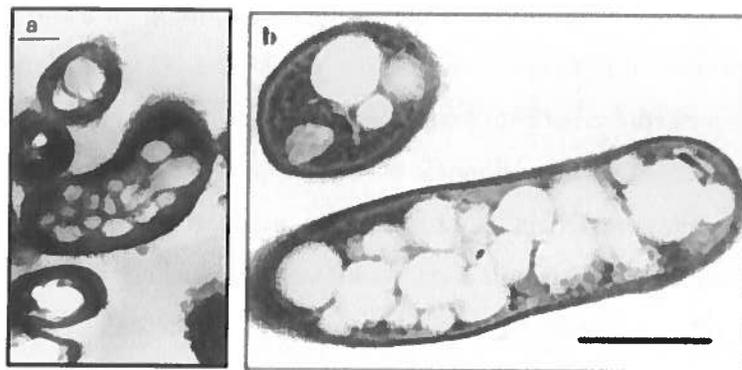


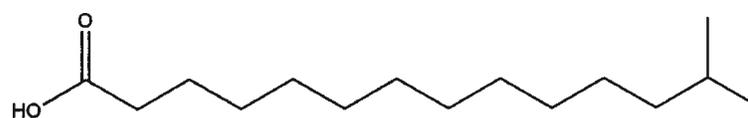
Figure 1.15. Analyse par microscopie électronique de granules lipidiques chez les streptomycètes A. *S. lividans* en phase stationnaire (48h). B. *S. avermitilis* en phase stationnaire (72h). La barre en a) représente 0.2 μm et 0.5 μm en b). Adapté de [188] et de [190] respectivement.

Bien que l'accumulation de TAGs chez les actinomycètes soit bien connue, il reste que les lipides observés chez les streptomycètes sont uniques de par leur nature [190]. En effet, l'analyse de la composition de ces lipides a démontré une prédominance d'esters

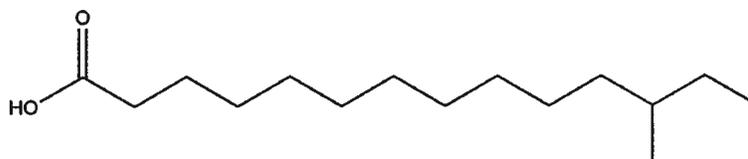
d'acides gras ramifiés *iso*- et *anteiso*- contenant un nombre impair de carbones dans la chaîne acyle [187-190]. La composition particulière des acides gras analysés chez *S. avermitilis* est représentée dans le Tableau 1.5 et schématisée dans la Figure 1.16. Une composition similaire a été observée chez *S. griseus*, *S. lividans* et *S. coelicolor*. De plus, l'accumulation de ces lipides rares a été corrélée avec une activité lipolytique intracellulaire [191, 192]. Néanmoins, la caractérisation biochimique des enzymes impliquées reste sommaire et pourrait être approfondie afin de mieux caractériser les lipases qui pourraient être impliquées [187, 190].

Tableau 1.5. Pourcentages des acides gras extraits de cellules entières de *S. avermitilis* cultivées en milieu MSM modifié. Adapté de [190].

Type d'acide gras	Proportion (%)
<i>iso</i> -C14:0	5.1
<i>iso</i> -C15:0	7.2
<i>anteiso</i> -C15:0	26.1
C15:0	6.3
<i>iso</i> -C16:0	14.4
C16:0	15.5
<i>iso</i> -C16:1	1.2
<i>anteiso</i> -C17:0	5.5



Acide *iso*-pentadecanoïque (méthyle-13-tétradécanoïque)



Acide *anteiso*-pentadecanoïque (méthyle-12-tétradécanoïque)

Figure 1.16. Exemples d'acides gras rares *iso*- et *anteiso*- retrouvés chez les streptomycètes.

1.4.3 Le potentiel lipolytique de *S. coelicolor*

Plusieurs études suggèrent que les streptomycètes sont des organismes lipolytiques [193-196]. L'annotation du génome de *S. coelicolor* suggère aussi la présence de plus de 30 gènes codant pour des carboxylestérases présomptives [142, 197, 198]. De ces gènes identifiés chez *S. coelicolor*, seulement deux estérases et trois lipases ont été caractérisées à ce jour [142, 197-200]. L'analyse biochimique de deux de ces lipases a tout de même démontré qu'il peut exister une grande diversité de spécificité et de températures optimales chez les lipases d'un même organisme. L'étude de la lipase SC111.14c a permis d'identifier son caractère mésophile (température optimale de 20-30°C) et sa spécificité envers des substrats à chaînes moyennes (C10-C12). Vujaklija et collaborateurs ont déterminé que cette lipase possédait aussi une activité aryle-estérase envers les esters de naphthyle [197]. La lipase SCBAC25F8.05c avait quant à elle clairement un comportement thermophile (45-55°C) et une plus grande affinité pour les substrats à chaînes longues (C16-C18) [198]. Le potentiel d'utiliser *S. coelicolor* comme source de lipases diversifiées pour la production d'esters d'acides gras est donc important et plusieurs études biochimiques restent à accomplir afin de caractériser ces enzymes présomptives.

1.5. Objectifs et hypothèses

1.5.1 Objectifs

L'objectif principal du présent travail est de concevoir un ou des biocatalyseurs adaptés à la production commerciale d'esters carboxyliques, principalement dans le but de synthétiser des composés aromatisés et des fragrances. Ces molécules ont une haute valeur ajoutée et leur production industrielle est laborieuse et onéreuse. L'impact majeur du développement de biocatalyseurs adaptés à la synthèse de ces esters sera une réduction des coûts de production et la possibilité d'apposer un label naturel aux molécules

produites selon un cadre de chimie verte. L'atteinte de l'objectif principal passe par quatre objectifs secondaires :

1. La construction d'une banque de lipases ayant un potentiel de synthèse d'esters carboxyliques. Le but est d'identifier des enzymes à fort potentiel en utilisant toutes les ressources mises à la disposition de ce projet. Les sources de la banque incluent le criblage d'organismes versatiles employés dans le laboratoire, des données métagénomiques provenant d'une étude antérieure au présent travail et l'utilisation, si possible, d'enzymes fournies par le partenaire industriel. La réalisation de cet objectif passe par quatre étapes :

- a) Le clonage des lipases présomptives identifiées par l'étude génomique de *S. coelicolor*.
- b) L'expression, la purification et la caractérisation biochimique des lipases clonées afin d'évaluer leur potentiel de synthèse organique.
- c) L'expression, la purification et la caractérisation biochimique des lipases identifiées lors d'une étude métagénomique antérieure.
- d) L'étude des lipases provenant du partenaire industriel.

2. La construction d'un système d'immobilisation simple et efficace basé sur l'expression d'enzymes recombinantes à l'aide de cellules entières. L'atteinte de cet objectif passe par deux étapes :

- a) La validation du système d'expression intracellulaire chez *E. coli*.
- b) L'évaluation du potentiel de transestérification et d'estérification des lipases immobilisées.

3. La construction d'un mini-réacteur pour valider l'utilisation du (des) biocatalyseur(s) en cellules entières dans la biosynthèse d'esters d'intérêt. L'atteinte de cet objectif passe par deux étapes :

- a) La validation du type de réacteur choisi pour la production d'esters.
- b) L'estimation des coûts de production du biocatalyseur et des coûts de son utilisation pour la biosynthèse des esters sélectionnés.

Les étapes du développement d'un biocatalyseur sont résumées dans la Figure 1.17. Ce cheminement se veut une ligne directrice plutôt qu'une démarche expérimentale détaillée à suivre.

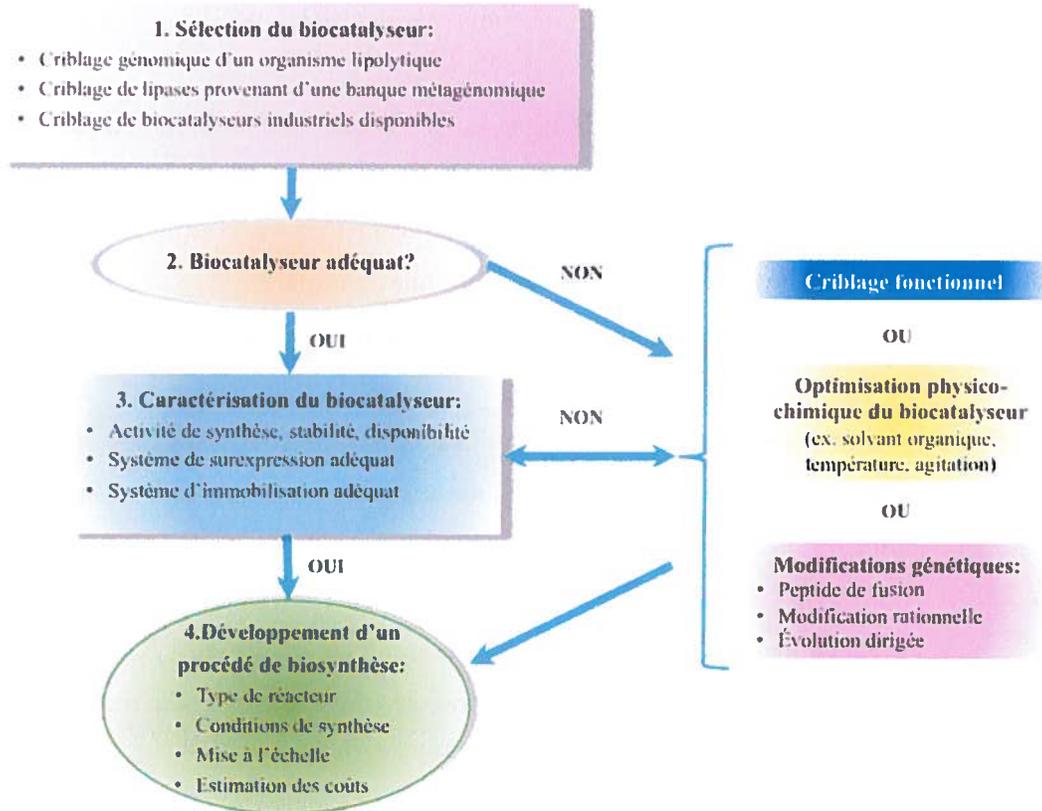


Figure 1.17. Schématisation des principales étapes de développement d'un biocatalyseur industriel.

1.5.2 Hypothèses

Hypothèse 1. Le criblage génomique d'un organisme lipolytique

Le criblage génomique d'organismes séquencés constitue une approche simple et efficace pour identifier de nouveaux gènes codant pour des enzymes lipolytiques. Il existe d'autres approches telles que les études de métagénomique ou les études d'évolution dirigée, mais elles impliquent des systèmes de criblage à haut débit. Ces études ne sont donc pas accessibles à toutes les équipes de recherche et peuvent s'avérer laborieuses en temps et en ressources nécessaires. Quant aux études d'évolution rationnelle d'enzymes caractérisées afin d'optimiser leur activité pour une application particulière, elles impliquent d'avoir sous la main des structures tridimensionnelles de qualité ou du moins des modèles d'homologie adéquats pour pouvoir être efficaces. Outre les outils bioinformatiques nécessaires, ces études ont le défaut de ne pouvoir s'appliquer qu'à peu de catalyseurs à la fois.

La démarche de criblage génomique a donc été sélectionnée pour sa simplicité afin d'évaluer le potentiel lipolytique d'un organisme versatile, *Streptomyces coelicolor*. La diversité génétique de cet organisme en fait un excellent candidat pour ce genre d'étude. D'ailleurs, plusieurs études ont permis d'identifier de nouvelles enzymes lipolytiques chez cette bactérie à partir du criblage de son génome [142, 197-199]. La diversité biochimique des enzymes répertoriées et le fait que cette espèce soit reconnue pour accumuler dans son cytoplasme des lipides particuliers laisse supposer qu'il pourrait y avoir des triacylglycérol hydrolases intracellulaires aux propriétés uniques chez cet organisme. Il a été décidé d'exprimer les gènes sélectionnés chez l'hôte hétérologue *E. coli*. Cet hôte a déjà été employé avec succès pour exprimer des gènes de streptomycètes issus d'un criblage génomique [143]. Notre hypothèse est donc que le criblage des gènes codant pour des enzymes lipolytiques intracellulaires présomptives permettra d'identifier de nouvelles lipases/estérases.

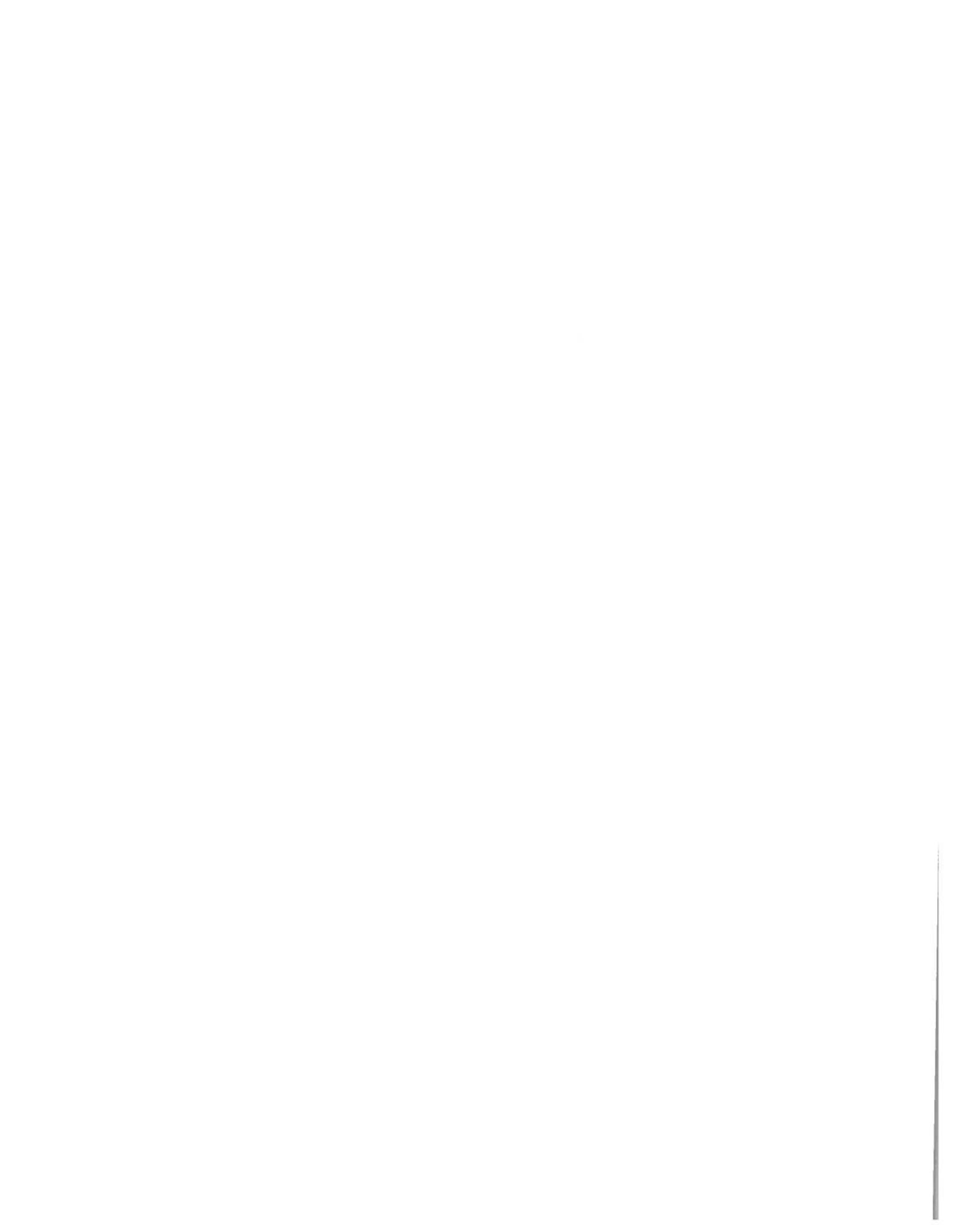
Hypothèse 2 : L'immobilisation de lipases provenant d'une étude métagénomique

Une étude métagénomique antérieure a permis d'identifier de nouvelles lipases à savoir les lipases LipIAF5-2, LipIAF1-6 et LipF5-11 [147, 160, 162]. Les enzymes identifiées provenaient de l'enrichissement d'un fermenteur pour la sélection d'organismes thermophiles et alcalophiles. Bien que la caractérisation biochimique faite à l'époque ait été sommaire et n'impliquait que des substrats artificiels, les caractéristiques de ces enzymes semblaient prometteuses pour d'éventuelles applications de synthèse avec des spécificités intéressantes ainsi qu'une bonne résistance à de fortes concentrations d'alcools primaires [160, 162]. Les enzymes recombinantes produites ont été exprimées chez *S. lividans* en raison de la haute teneur en bases G+C dans la séquence des gènes. Bien que cette approche se soit avérée fructueuse, les niveaux d'expression recombinante étaient trop faibles pour envisager toute application industrielle. De plus, la présence d'activité lipolytique endogène aux streptomycètes aurait pu compliquer les étapes de purification et de caractérisation des enzymes recombinantes [193, 194]. Il a donc été décidé d'exprimer les gènes de lipases chez des hôtes hétérologues non-lipolytiques. L'expression chez *E. coli* a été choisie pour sa simplicité de culture et son efficacité d'expression recombinante. De plus, il a été décidé d'exprimer de façon intracellulaire les gènes sélectionnés afin de pouvoir produire et immobiliser les enzymes en une seule étape simple. Notre hypothèse est que l'expression intracellulaire de ces gènes permettra la production simple d'un biocatalyseur immobilisé capable de faire des réactions de synthèse d'esters carboxyliques.

Hypothèse 3. L'évaluation du potentiel d'application du biocatalyseur

L'optimisation des conditions de synthèse et le choix du type de vaisseau réactionnel sont des paramètres importants afin de pouvoir évaluer l'efficacité et éventuellement les coûts d'utilisation du (des) biocatalyseur(s). Bien que les réacteurs en cuvée soient les plus utilisés en laboratoire à cause de leur simplicité, la plupart des bioréacteurs employés en industrie sont du modèle à lit compact [28]. Ces réacteurs

offrent de hauts rendements de production et minimisent les forces de cisaillement appliquées sur le biocatalyseur immobilisé. De plus, ils facilitent grandement la récupération du biocatalyseur en vue d'une utilisation subséquente. Marty et collaborateurs ont réussi à produire en continu du biodiesel pendant plus de 50 jours grâce à un réacteur à lit compacté contenant le biocatalyseur Novozyme 435 [201] Notre hypothèse est donc que l'utilisation de cellules entières de *E. coli* en réacteur à lit compacté permettra de synthétiser efficacement des esters carboxyliques. De plus, il est attendu que ce type de réacteur permettra de réutiliser plusieurs fois le biocatalyseur.



Chapitre 2. Premier article scientifique



2.1 Préface au chapitre 2.

2.1.1 La sélection de gènes lipolytiques chez *S. coelicolor*

L'annotation du génome de *S. coelicolor* A3(2) suggère la présence d'au moins 31 gènes codant pour des lipases/estérases présomptives contenant le motif consensus Gly-X_{aa}-Ser-X_{aa}-Gly [199]. Ce motif est fortement conservé parmi les sérines hydrolases qui comprennent les estérases et les lipases et constitue donc un outil efficace pour le criblage génomique sans toutefois permettre de discriminer entre les deux classes d'enzymes [49, 202, 203]. L'annotation d'un autre actinomycète, *S. avermitilis*, suggère la présence de 20 gènes provisionnels codant pour les mêmes classes d'enzymes [204]. Les deux espèces ont en commun 16 gènes lipolytiques présomptifs [199]. Il a donc été décidé de se concentrer sur les 15 gènes qui sont spécifiques à *S. coelicolor* (Annexe I) basé sur l'hypothèse que les gènes propres à une espèce pourraient présenter une plus grande diversité génétique que les gènes hautement conservés parmi plusieurs espèces d'un même genre.

2.1.2 Objectifs et hypothèses

Les séquences primaires de ces 15 gènes ont été analysées grâce au serveur SignalP 4.1 afin d'identifier les gènes codant pour des protéines intracellulaires présomptives [205]. *S. coelicolor* peut accumuler d'importantes quantités cytoplasmiques de TAGs aux chaînes acyles particulières et cette accumulation est associée à une activité lipolytique qu'il reste à caractériser [187, 188]. L'objectif principal de cette analyse est de construire une banque d'enzymes lipolytiques pour évaluer leur potentiel pour la biosynthèse d'esters carboxyliques. Notre hypothèse est qu'il existe parmi les protéines intracellulaires sélectionnées des lipases/estérases aux spécificités particulières capables de synthétiser des esters d'acides gras.

2.1.3 Présentation du 1^{er} manuscrit

L'article scientifique présenté constitue une étude de la caractérisation biochimique d'une nouvelle enzyme lipolytique intracellulaire de *S. coelicolor*, la protéine SCP8.28c (EstC). Ce manuscrit a été publié par la revue d'accès libre PLoS ONE (www.plosone.org; facteur d'impact de 3.730 en date de juin 2013). Le manuscrit a été accepté le 18 janvier 2012 et publié le 2 mars 2012 dans le numéro 3 du volume 7 de la revue avec le numéro d'accèsion électronique du journal e32041 et le doi:10.1371/journal.pone.0032041. À ce jour, l'article a été vu 2561 fois et cité huit fois (en date d'avril 2014). La version formatée par l'éditeur sous format PDF et publiée en ligne est présentée dans le présent document.

2.2 Contribution des auteurs

Les travaux présentés dans cet article ont été entièrement réalisés par l'étudiant sous la supervision de F. Shareck et de N. Doucet. Le manuscrit a été rédigé en majorité par l'étudiant et par N. Doucet. Le manuscrit a été révisé par F. Shareck., F. Lépine et Y. Hurtubise (superviseur industriel). Deux parties de sections ont été rédigées par F. Lépine, soit la partie «Mass spectrometry» de la section «Materials and Methods» ainsi que la partie de la section «Results and Discussion» portant sur l'analyse des données de spectrométrie de masse.

2.3 Résumé

Les séquences génomiques de *Streptomyces coelicolor* A3(2) contiendraient au moins 50 gènes provisionnels codant pour des enzymes lipolytiques. Plusieurs études ont démontré la capacité de cet actinomycète à accumuler d'importantes réserves cytoplasmiques de triglycérides lorsque les nutriments du milieu de culture sont épuisés. Dans cette étude, nous utilisons le criblage du génome de *S. coelicolor* afin d'identifier

des gènes codant pour des lipases/estérases présomptives intracellulaires. Deux gènes ont été clonés et exprimés avec succès chez *E. coli* comme protéines de fusion avec une étiquette poly-histidines à l'extrémité N-terminale. L'une des enzymes recombinantes, EstC, a présenté une activité estérase psychrophile intéressante, suggérant un fort potentiel d'application pour la synthèse d'esters fragiles. L'enzyme purifiée a démontré une température optimale de 35°C et était active à basse température avec 25% d'activité relative à 10°C. L'enzyme avait une activité optimale aux pH de 8.5-9, mais a tout de même conservé 75% de son activité maximale dans l'intervalle de pH 7.5-10. L'enzyme a aussi démontré une excellente stabilité aux pH allant de 6 jusqu'à 11. L'enzyme était active envers les esters de *p*-NP (chaînes acyles de 2 à 12 carbones) avec une activité maximale envers le *p*-NP-valérate (C5) ($k_{cat}/k_m = 737 \pm 77 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). L'enzyme était très active pour l'hydrolyse de triglycérides à chaînes courtes comme le glycéryle triacétate (C2 :0) et le glycéryle tributyrate (C4 :0), en plus de démontrer une bonne tolérance aux alcools primaires et aux solvants organiques. Ces résultats suggèrent que cette enzyme pourrait être une bonne candidate pour la synthèse d'esters à chaînes courtes comme les arômes et fragrances.

2.4 Article 1

Isolation and Characterization of EstC, a New Cold-Active Esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Guillaume Brault¹, François Shareck¹, Yves Hurtubise², François Lépine¹, Nicolas Doucet^{1*}

¹ INRS Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada, ² Innu Science Canada, Inc., Trois Rivières, Québec, Canada

Abstract

The genome sequence of *Streptomyces coelicolor* A3(2) contains more than 50 genes coding for putative lipolytic enzymes. Many studies have shown the capacity of this actinomycete to store important reserves of intracellular triacylglycerols in nutrient depletion situations. In the present study, we used genome mining of *S. coelicolor* to identify genes coding for putative, non-secreted esterases/lipases. Two genes were cloned and successfully overexpressed in *E. coli* as His-tagged fusion proteins. One of the recombinant enzymes, EstC, showed interesting cold-active esterase activity with a strong potential for the production of valuable esters. The purified enzyme displayed optimal activity at 35°C and was cold-active with retention of 25% relative activity at 10°C. Its optimal pH was 8.5–9 but the enzyme kept more than 75% of its maximal activity between pH 7.5 and 10. EstC also showed remarkable tolerance over a wide range of pH values, retaining almost full residual activity between pH 6–11. The enzyme was active toward short-chain *p*-nitrophenyl esters (C2–C12), displaying optimal activity with the valerate (C5) ester ($k_{cat}/K_m = 737 \pm 77 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). The enzyme was also very active toward short chain triglycerides such as triacetin (C2:0) and tributyrin (C4:0). In addition to showing good primary alcohol and organic solvent tolerance, suggesting it could function as an interesting candidate for organic synthesis of short-chain esters such as flavors.

Citation: Brault G, Shareck F, Hurtubise Y, Lépine F, Doucet N (2012) Isolation and Characterization of EstC, a New Cold-Active Esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). PLoS ONE 7(3): e32041. doi:10.1371/journal.pone.0032041

Editor: Mark R. Liles, Auburn University, United States of America

Received: September 16, 2011; **Accepted:** January 18, 2012; **Published:** March 2, 2012

Copyright: © 2012 Brault et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Collaborative Research and Development grant (awarded to Dr. Shareck) and NSERC Discovery grant RGPIN 402623-2011 (awarded to Dr. Doucet), as well as private funding from Innu Science Canada. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have the following conflicts: Dr. Hurtubise is the research and development director of the commercial company Innu Science Canada, Inc. Dr. Brault's salary is provided by a grant from the Canadian and Quebec Governments through the BMP Innovation scholarship program, aimed at fostering the development of university-industry partnerships. Dr. Brault is a PhD student in Dr. Shareck's lab at INRS, and does not commercially benefit from the publication of this manuscript. As grant recipients from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Dr. Shareck and Dr. Doucet are two academic professors involved in collaborative research projects with Dr. Hurtubise's team at Innu Science. Dr. Shareck and Dr. Doucet are not commercially involved with Innu Science and neither owns stocks or shares in the company. Dr. Hurtubise and Innu Science are fully committed to the full disclosure of all results and research materials resulting from the current research. All authors proclaim that this declaration of competing interests does not alter their adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: nicolas.doucet@iaf.inrs.ca

Introduction

Carboxylesterases (EC 3.1.1.1) and lipases (triacylglycerol hydrolases; EC 3.1.1.3) are important industrial enzymes with numerous applications in biotechnology (reviewed in [1]). Esterases hydrolyze water-soluble or emulsified esters with relatively short fatty acid chains (<than 10 carbons) while "true" lipases are generally more active toward emulsified, long-chain fatty acids [2,3]. These enzymes, which catalyze reactions in a regio- and/or enantioselective fashion [4], can catalyze the release of free fatty acids from triglycerides and under certain conditions can also perform esterification and transesterification reactions. Furthermore, these biocatalysts are generally stable in organic solvents, allowing their use in numerous industrial applications [5]. Although lipolytic enzymes are found in all living organisms, most of the commercial enzymes originate from microbial sources. As a result, bacterial genome mining of versatile microorganisms offers an attractive opportunity to uncover new lipolytic biocatalysts displaying interesting biochemical properties.

Bacterial lipases and esterases are grouped into 8 different families based on their sequence, structure and biological function

[6]. In all cases, these enzymes are characterized by a typical catalytic triad formed of a nucleophilic serine, a catalytic acid (aspartate or glutamate) and a histidine residue, all of which appear in this order in the protein sequence (Figure 1) [6]. The catalytic serine is typically located among a conserved Gly-X_{aa}-Ser-X_{aa}-Gly pentapeptide which forms a sharp elbow in the center of the canonical α/β -fold [3]. Many reports suggest that true lipases are distinguished from esterases by harboring a lid domain that covers the hydrophobic catalytic cleft [7,8]. This lid moves to expose the catalytic cleft at the lipid-water interface following an activation mechanism typical of lipases. However, numerous reports reveal exceptions to this rule, such as the well-studied *Candida antarctica* Lip B [6,7,9].

Streptomycetes are ubiquitous soil-dwelling saprophyte bacteria that can feed on diverse carbon sources available in the soil biotope. These Gram-positive, filamentous bacteria are best known as producers of numerous antibiotics as well as various extracellular hydrolytic enzymes [10,11]. As a result, it is not surprising that ubiquitous lipolytic activity can be found among streptomycetes [10–14]. Some reports also show that streptomycetes such as *Streptomyces coelicolor* and the closely related specie

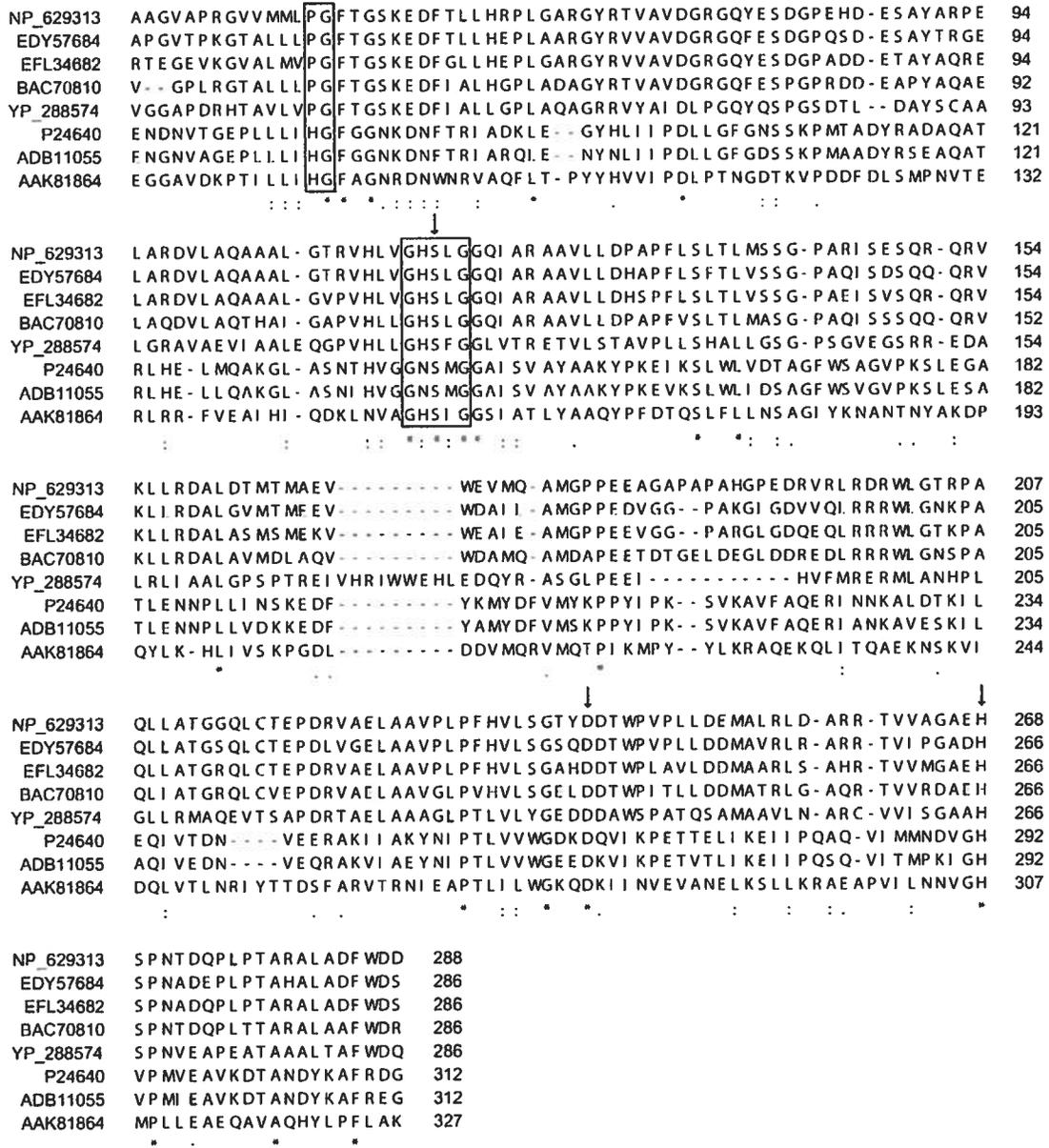


Figure 1. Sequence alignment of EstC with homologous lipases. NP_629313, EstC from *S. coelicolor* A3(2); EDY57684, putative hydrolase from *S. svicensis* ATCC 29083; EFL34682, putative hydrolase from *S. viridochromogenes* DSM 40736; BAC70810, putative hydrolase from *S. avermitilis* MA-4680; YP_288574, putative hydrolase from *Thermobifida fusca* strain YX; P24640, lipase 3 from *Moraxella* sp.; ADB11055, lipase from *Psychrobacter* sp. G; AAK81864, lipase from *Streptococcus* sp. (N1). The conserved PVX_{aa}-5er-X_{aa}-Gly pentapeptide and the proposed oxyanion hole are boxed. Residues of the catalytic triad are shown by arrows. Sequence alignment was performed with Toffee [52,53]. doi:10.1371/journal.pone.0032041.g001

Streptomyces lividans are capable of important accumulations of cytoplasmic triacylglycerols (TAGs) in the stationary phase [15–18]. It was presumed that the build-up of TAGs could serve as a carbon source for the synthesis of polyketide antibiotics in nutrient

depletion situations [15,19,20]. However, recent findings suggest that the storage of TAGs could simply be used as an energy reserve [16]. Nevertheless, streptomycetes differ from most lipid accumulating bacteria, which generally synthesize specialized

polyesters such as poly(3-hydroxybutyric acid) (poly(3HB)) or other polyhydroxyalkanoic acids (PHA) [17]. While the accumulation of TAGs is a common feature among actinomycetes, streptomycetes differ in the accumulation of neutral lipids of rare types, such as *iso*- and *anteiso*-ramified TAGs with odd carbon chains (13, 15 and 17 carbons) [17,19]. Furthermore, this accumulation of TAGs was recently correlated to the activation of lipolytic activity [15,18], but the characterization of lipolytic enzymes implicated in such activity remains elusive [17,21].

The genome of *Streptomyces coelicolor* A3(2) was the first member of the streptomycetes to be fully sequenced [22]. Genome annotation of this organism showed that at least 50 open reading frames (ORFs) encode for putative lipolytic enzymes [23], five of which have been characterized so far: SCO0713 (*lipA*), SCO1725, SCO7513, SCO7131 (*estA*), and SCO6966 (*estB*) [21,23–25]. In addition to being cold-active and thermostable, these enzymes show broad substrate specificities for TAGs and aryl-esters. However, previous reports mainly focused on extracellular enzymes of *S. coelicolor*. Because this organism can store important reserves of odd-carbon chains, ramified TAGs, characterization of intracellular putative lipolytic biocatalysts might result in the uncovering of enzymes with interesting substrate specificities. In the present study, we used genome mining of *S. coelicolor* to identify genes encoding putative, non-secreted esterases/lipases. Two genes were cloned and successfully overexpressed in *E. coli* as His-tagged fusion proteins. One of the recombinant enzymes, EstC, showed interesting cold-active esterase activity with a strong potential for the production of valuable esters. The enzymatic characterization of EstC is herein presented in comparison with its homologue EstB and several other cold-active lipolytic enzymes of the same family. Our results suggest that EstC demonstrates unique features that deserve further consideration for cold-adapted industrial processes.

Materials and Methods

Bacterial strains and plasmids

The strain *Escherichia coli* BL21 (DE3) was employed for all subcloning and heterologous expression of selected genes. Expression vector pET16b (EMD Chemicals) was used for the production of the N-terminal histidine-tagged recombinant proteins. Genomic DNA employed for gene amplification was extracted from *Streptomyces coelicolor* M145 following standard procedures [26].

DNA manipulations

From the available annotated genome sequence [22], genes coding for putative lipolytic enzymes without a secretion signal peptide were selected for subcloning (Table S1). Sequences of the annotated putative genes were analyzed using the SignalP 3.0 server (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Genes without a Gram-positive secretion peptide signal were selected for subsequent amplification by PCR. Selected genes were *estB* (SC6F7.19c, locus SCO6966) and *estC* (SCP8.28c, locus SCO5165). The recombinant genes were PCR-amplified using the following primers: 6F7.19c-5' (5'-AAACATATGGCCGAGGCCCGCGA-GCACACG-3'), 6F7.19c-3' (5'-ATTCTCGAGTCAGCCGGCG-GAGCAGCCCGTC-3') for the *estB* gene, and SCP8_NdeI (5'-AAACATATGGTGAGCAGGAACGCCCGCCTTC-3'), SCP8_XhoI (5'-TTTCTCGAGTCAGCCGACGTCAGC-3') for the *estC* gene. Restriction sites were added to both ends (5'-*NdeI* and 3'-*XhoI*, both underlined) to allow subcloning in vector pET16b. PCR-amplified fragments were cleaned using Qiagen PCR cleaning kit, cloned into the *NdeI/XhoI*-digested pET16b, and

transformed into *E. coli* BL21 (DE3), yielding the pET16b-*EstB* and pET16b-*EstC* constructs used for protein expression. The integrity of both mutant plasmid strands was confirmed by DNA sequencing using forward and reverse T7 universal primers (Genome Quebec).

Heterologous expression and purification

For heterologous expression, 100 mL of Luria-Bertani (LB) medium containing 100 µg/mL of carbenicillin was inoculated from a fresh Petri dish. The liquid culture was incubated at 37°C and 240 rpm until it reached an A_{600} of 0.6–0.8, after which it was cooled on ice and induced by the addition of 0.25 mM IPTG. The culture was further incubated 24 h under agitation (240 rpm) at 16°C. Cells were harvested, washed with 50 mM bicine buffer pH 7.0 and the cell pellet was resuspended in Q-Proteome lysis buffer (Qiagen). To ensure complete lysis, cells were further disrupted with 250 mg/mL of 0.1 mm silica beads employing a Fast-Prep bead-beater (Biospec). Cells were shaken at 6 m/s for two bursts of 45 seconds. Lysed cells were centrifuged for 15 min at 15 000 g and 4°C to remove cell debris. The soluble fraction was filtered on a 0.22 µm membrane, diluted with 1 volume of binding buffer (100 mM bicine pH 8.3, 600 mM NaCl, and 20 mM imidazole), and loaded on a Ni-NTA column (Qiagen). The column contained 3 mL of agarose beads in a Fastprep holder (Bio-Rad) and binding was done by incubation for 60 min at 4°C. The column was then washed with 5 column volumes of 50 mM bicine pH 8.3, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, and the protein was eluted with 5 column volumes of the same buffer containing 250 mM imidazole. Fractions of 2 mL were collected and analyzed by SDS-PAGE and Western blot. Fractions containing the recombinant enzymes were desalted in 50 mM bicine buffer pH 8.5 by ultrafiltration using a 3 kDa Amicon membrane. Protein concentration was determined by a BCA kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions.

SDS-PAGE and Western blot

Fractions obtained from chromatography were analyzed using standard SDS-PAGE procedures with commercial precast 12% RumiBlue® gels (Expedeon). Gels were stained with Rapid Stain (Expedeon). Transblot was done over a PVDF membrane in cold transfer buffer (Tris 12 mM, glycine 96 mM, 20% (v/v) methanol). Recombinant His-tagged proteins were revealed with a 1/5000 dilution of anti-penta His-HRP monoclonal antibody (Qiagen) in the kit blocking buffer. Bands were revealed using 1 mM *o*-dianisidine in a revealing solution (100 mM KH_2PO_4 , 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5% H_2O_2 (v/v)).

Zymogram analysis

In-gel enzymatic activity was performed according to a previously described SDS-PAGE procedure [25] with the following modifications. Proteins were heated at 70°C for 10 min in a Laemmli sample buffer without dithiothreitol (DTT) or β -mercaptoethanol, and loaded on a 12% Expedeon gel. To remove SDS, the gel was washed twice for 15 minutes in a refolding buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% casein (w/v)) with gentle agitation, and further incubated 30 min in 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2% Triton X-100 (v/v). Gels were finally washed twice with deionized water to remove Triton X-100. The lipolytic activity was visualized under UV illumination after a 5-minute incubation in a 20 mM Tris-HCl pH 8.0 solution containing 100 µM of 4-methyl-umbelliferyl (MUF)-butyrate [27].

Mass spectrometry

The mass spectrum of the whole protein was obtained with a Quattro Premier XE (Waters) by infusion of a 10% acetic acid aqueous solution of the purified protein and using a scan range of m/z 700 to 1100. Deconvolution of the resulting mass spectra was performed using the MaxEnt1 software (Micromass). For peptide sequencing, stained SDS-PAGE bands were excised and treated as mentioned previously [25]. The hydrolyzed peptides were analyzed using a Q-Trap hybrid linear ion trap triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems) coupled to an Agilent 1100 Nanopump equipped with a 75 μm \times 150 mm Zorbax 300SB C₁₈ column (Agilent). Accumulation of MS-MS data was performed with the Analyst Software version 1.4 (Applied Biosystems). Mascot (Matrix Science) was used to create peak lists from MS and MS-MS raw data.

Enzyme assays

Standard assays and enzyme kinetics. Standard assays were done by measuring the rate of hydrolysis of different *p*-nitrophenyl saturated fatty acid esters (*p*NP-C2:0 to *p*NP-C18:0). Substrates were prepared as 50 mM stocks in HPLC-grade 2-propanol and conserved at -80°C . All reactions were performed in triplicates using standard 96-well microplates. Each well contained 0.2 mL of reaction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1% Triton X-100 (v/v) and 0.5 mM of each substrate), and the reactions were started by the addition of 0.02 mL of enzyme diluted at 0.0125 mg/mL. Reactions were monitored every 30 seconds for 5 minutes at 405 nm and 25°C employing a thermostated Varioskan microplate reader (Thermo Electron Corp.).

Enzyme kinetic assays were done using short-chain *p*NP-esters (C2, C4, C5, C6 and C8) at concentrations varying from 0.025 to 6.0 mM in the aforementioned assay buffer at the optimal temperature of 35°C. One unit (U) was defined as the amount of enzyme needed to release 1 μmol of *p*NP per minute. Initial velocity versus substrate concentration data was fitted to a non-linear regression transformation using the GraphPad Prism 3.0 software. The catalytic rate constant k_{cat} (s^{-1}) was calculated from the initial velocity according to the equation $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/[E]$. Assays with triglycerides were performed using a pH stat method employing a Metrohm 800 Dosino coupled to a thermostatic circulating water bath. Briefly, the fatty acids released from glyceryl triacetin (C2:0) and glyceryl tributyrin (C4:0) were automatically titrated using a 0.05N NaOH solution to maintain a constant pH of 8.5 at 35°C in a jacketed vessel. Stable emulsions of each substrate were prepared in 5 mM Tris-HCl pH 8.5 containing 1% (w/v) arabic gum using a kitchen mixer (Magic Bullet®) for 2 minutes at 3000 rpm. Reactions were performed in 29 mL of each substrate solutions and were started by the addition of 1 mL of the various enzyme dilutions under vigorous agitation. The release of fatty acids was automatically titrated using the Tiamo software version 1.3 and the activity was measured as microequivalents (μeq) of NaOH necessary to neutralize the free fatty acid released from the enzymatic reaction in 1 minute. One unit (U) was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of fatty acid per minute in the conditions described.

Effect of pH on enzyme activity. Determination of enzyme activity at different pH values was performed in 40 mM sodium acetate, 50 mM MES, 50 mM glycine, 40 mM Tris buffer with *p*NP-C8 as substrate to minimize spontaneous hydrolysis observed at higher pH. Reactions were run for 5 min at 25°C and subsequently quenched with 10% (v/v) of 3N HCl. The pH was then titrated back to 8.5 and the released *p*-nitrophenol (*p*NP) was measured at 405 nm. Impact of enzyme pre-incubation at

different pH values was performed by incubating 5 μg of enzyme in 0.1 mL of 40 mM sodium acetate, 50 mM MES, 50 mM glycine, 40 mM Tris buffer at 25°C for one hour. The enzyme was then diluted 4-fold and used in the same assay conditions as previously mentioned with *p*NP-C5 as substrate.

Effect of temperature on enzyme activity. The effect of temperature on enzyme activity was determined by assaying the hydrolytic activity towards *p*NP-C8 in 1 mL cuvettes using a thermo-controlled Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer (Perkin Elmer) coupled to an Isotemp 3016D water bath (Fisher Scientific). Thermostability assays were done by incubating 5 μg of enzyme in a 50 mM Tris-HCl pH 8.5 buffer at various temperatures for 1 hour before being cooled on ice. Residual activity was measured as mentioned above.

Effect of ions, agents, and organic solvents on enzyme activity. Effect of various ions, agents, and organic solvents on enzyme activity was determined by pre-incubating 5 μg of the purified enzyme for one hour in 50 mM Tris-HCl pH 8.5 at 25°C. Water-miscible solvent concentrations tested were 10 and 30% (v/v). After a 1-hour pre-incubation, the enzyme was diluted 4-fold to ensure minimal carry-over for the standard assay. Residual activity toward *p*NP-C5 was compared to that of the enzyme incubated in a 50 mM Tris-HCl pH 8.5 buffer at 25°C without any organic solvent.

Results and Discussion

Lipolytic enzymes are important biotechnological tools for various industrial applications. Lately, enzymes from psychrophilic microorganisms have attracted much attention because of their high catalytic activity at low temperatures and their inherently broad substrate specificity relative to their thermophilic counterparts [28]. These properties allow the use of cold-active lipases and carboxylesterases in numerous applications of the detergent and dairy industries, in addition to the organic synthesis of fragile pharmaceutical compounds [28]. Therefore, a great deal of effort has been devoted to the discovery and characterization of new lipolytic enzymes from various psychrophilic microorganisms [29–36]. Genome mining of versatile mesophilic microbes such as *S. coelicolor* has also proven to be a successful source of cold-adapted lipolytic enzymes [23]. Also, *S. coelicolor* was shown to accumulate important amounts of cytoplasmic TAGs during the stationary growth. While build-up of TAGs is common among eukaryotes and some prokaryotes, the saturated, odd-numbered carbon chain TAGs of *S. coelicolor* are unique in composition [16]. Their metabolism is associated with inherent but yet uncharacterized lipolytic activity [15,18]. Herein we focus on the characterization of the intracellular esterase EstC from *S. coelicolor*, an enzyme displaying promising activity for cold-adapted industrial processes.

Genome mining of *S. coelicolor* predicted the existence of more than 50 putative lipolytic enzymes [23]. We analyzed all sequences with the SignalP server (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) and surveyed the putative hydrolases for the absence of a Gram-positive secretion signal peptide. This allowed the identification of seven genes as possible cytoplasmic enzymes (Table S1). All seven genes were cloned in the pET16b vector but only SCO5165, SCO6966 and SCO7131 were successfully overexpressed as soluble proteins. Since two of those genes had already been fully characterized as esterases (SCO7131 (*estA*) and SCO6966 (*estB*)) [23,24], we focused on the third member of this gene family (SCO5165). Preliminary enzyme characterization showed that the protein product of SCO5165 is only active toward MUF-butyrate and displays no activity toward MUF-palmitate and MUF-oleate, suggesting carboxylesterase specificity (results not shown). In

accordance with the previously characterized esterases of *S. coelicolor* [23,24], the protein product of SCO5165 was named EstC.

Alignment of EstC amino acid sequence with several putative hydrolases predicts a typical α/β -hydrolase fold characteristic of lipolytic enzymes of the esterase/lipase/thioesterase family (EMBL-EBI InterPro search results, Figure 1). All of the lipases whose three dimensional structures have been resolved so far exhibit this characteristic α/β fold [37]. The BLASTP tool was employed to find homologues of EstC among the non-redundant protein sequence data deposited at the National Center for Biotechnology Information database. BLASTP results show that EstC has very low identity outside putative hydrolases present among many *Streptomyces* members such as *S. viricus* ATCC 29083 (EDY57614; 77% identity, 85% positive homology), *S. viridochromogenes* DSM 40736 (EFL34602; 77% identity, 84% positive homology) and *S. avermitilis* MA-4680 (NC_007333, 70% identity, 71% positive homology). However, in comparison to the functionally characterized intracellular esterases of *S. coelicolor* EstA and EstB, EstC shares no obvious sequence identity. Also, TCollec alignments show that EstC shares little similarity with various members of the different bacterial lipase families. The closest similarity was found with members of group V, which comprises many cold-adapted lipases such as *Mucovella* sp. lipase 3 (P24640; 31% identity and 49% positive similarity) and *Psychrobacter* sp. G lipase (ADB11055; 31% identity and 51% positive similarity) [6,38]. These results were confirmed with a BLAST against the Microbial Lipase and Esterase Database (MELDI), where EstC was assigned as a true lipase in a cluster with experimentally confirmed lipases of family V (MELDI cluster LiCl_6). Alignment with these lipases allowed the identification of the conserved catalytic triad formed by the pentapeptide Gly-X_{aa}-Ser-X_{aa}-Gly, where the nucleophilic residue is Ser¹¹⁶ and the putative catalytic residues are Asp²¹¹ and His²⁶⁰ (Figure 1). However, the catalytic serine was found in a different motif GHSLGGQ (Gly¹¹¹-Glu¹²⁰) that seems conserved among streptomycetes. Finally, lipases generally retain the conserved N-terminal sequence IIG, which was proposed to act as an oxyanion hole during catalysis [6,39]. Our alignment shows the presence of an altered sequence PGFTG (Pro¹⁶-Gly⁵⁰) that aligns with the family V oxyanion hole motif IIGFGG (Figure 1).

The His-tagged recombinant EstC protein was purified to near homogeneity using a simple immobilized metal affinity chromatography (IMAC) (Figure 2). Two endogenous lipolytic enzymes were present in the *E. coli* strain with control plasmid, both of which were further efficiently discarded by chromatography (Figure 2B). The recombinant EstC protein showed an apparent molecular weight of 35 kDa, consistent with the expected theoretical weight of 34.6 kDa (including the His-tag). Silver-stained SDS-PAGE showed no protein contaminant and the identity of the protein was confirmed with Anti-His-tag Western blot analysis (results not shown). The identified protein was further digested for peptide sequencing using mass spectrometry with Mascot analysis. The peptide sequences identified by Mascot were solely attributed to the NP_629313 (EstC) protein of *S. coelicolor* A3(2), with an excellent 39% sequence coverage and MOWSE score of 400, providing unequivocal evidence of the purified protein identity. Mass spectrometry analysis of the purified protein confirmed a total protein mass of 34665 Da, corresponding exactly to the mass of the His-tagged EstC without its initiator formyl-methionine.

Substrate preference of the recombinant EstC was determined using various *p*-nitrophenyl esters (C2 to C18). EstC was primarily active toward short and medium chain esters (C2 to C12), with an

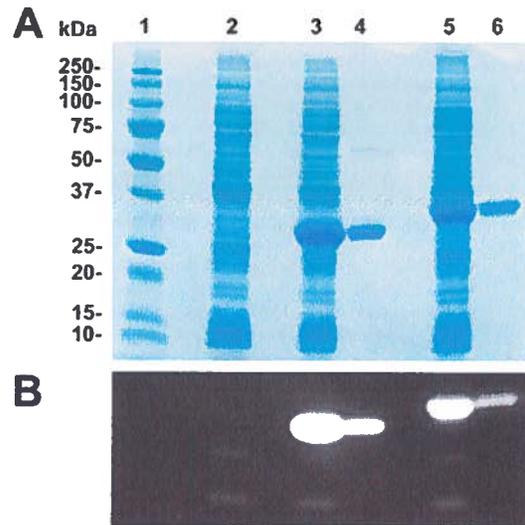


Figure 2. SDS-PAGE and zymogram of purified recombinant proteins. A) SDS-PAGE. Lane 1: Precision Plus All Blue molecular weight standard (Bio-Rad). Lane 2: Soluble fraction of control strain harboring vector pET16b. Lanes 3 and 5: Soluble fractions of *E. coli* strains harboring pET-EstB and pET-EstC vectors, respectively. Lane 4: Purified EstB after IMAC chromatography. Lane 6: Purified EstC after IMAC chromatography. B) Zymogram. Lane order is identical to panel A. The equivalent of 5 μ g of purified enzymes were loaded in lanes 4 and 6.

doi:10.1371/journal.pone.0032041.g002

optimal activity observed with *p*NP-C5 (Figure 3A). While the enzyme can hydrolyze long-chain esters, the measured activities are low relative to short-chain esters, showing only $7.4 \pm 0.5\%$ and $2.9 \pm 1.7\%$ for *p*NP-C14 and *p*NP-C16, respectively. Enzyme activity is practically nonexistent against *p*NP-C18. Cold-active lipase LipP from *Pseudomonas* sp. (strain B11-1) also showed similar short to mid-chain substrate specificity and very poor activity toward long chain substrates [29]. These results suggest that EstC could be classified as an intracellular esterase rather than a true lipase [40]. The optimal pH of EstC was tested using *p*NP-C8 in a pH range of 3–12. The enzyme was typically active at alkaline pH, with more than 75% of its maximal activity observed between pH 7.5 and 10 (Figure 3B). Still, maximal activity was observed in a very narrow range of pH 8.5–9. Nevertheless, the enzyme showed remarkable tolerance over a wide range of pH, with almost full residual activity observed between pH 6 and 11 (Figure 3B). Similar remarkable alkaline tolerance has also been reported on the *S. coelicolor* EstB and cold-active lipase LipA1 isolated from an Antarctic strain of *Psychrobacter* sp. 7195 [23,41]. Alkaline tolerance of lipases is a very useful property for a number of industrial applications such as additives for laundry detergents.

The effect of temperature on EstC was determined by monitoring the hydrolysis of *p*NP-CB at various temperatures from 5 to 50°C. Maximum activity was observed at 35–40°C but the enzyme retained more than 25% of its activity at 10°C (Figure 3C), suggesting it is also a cold-active esterase like EstB [23]. Similar temperature activity was also observed for the cold-active lipase of the mesophilic *Streptococcus* sp. N1 (optimal temperature of 37°C) and various cold-active lipases such as K.B-Lip from *Pseudomonas* sp. (strain KB700A) and a lipase secreted

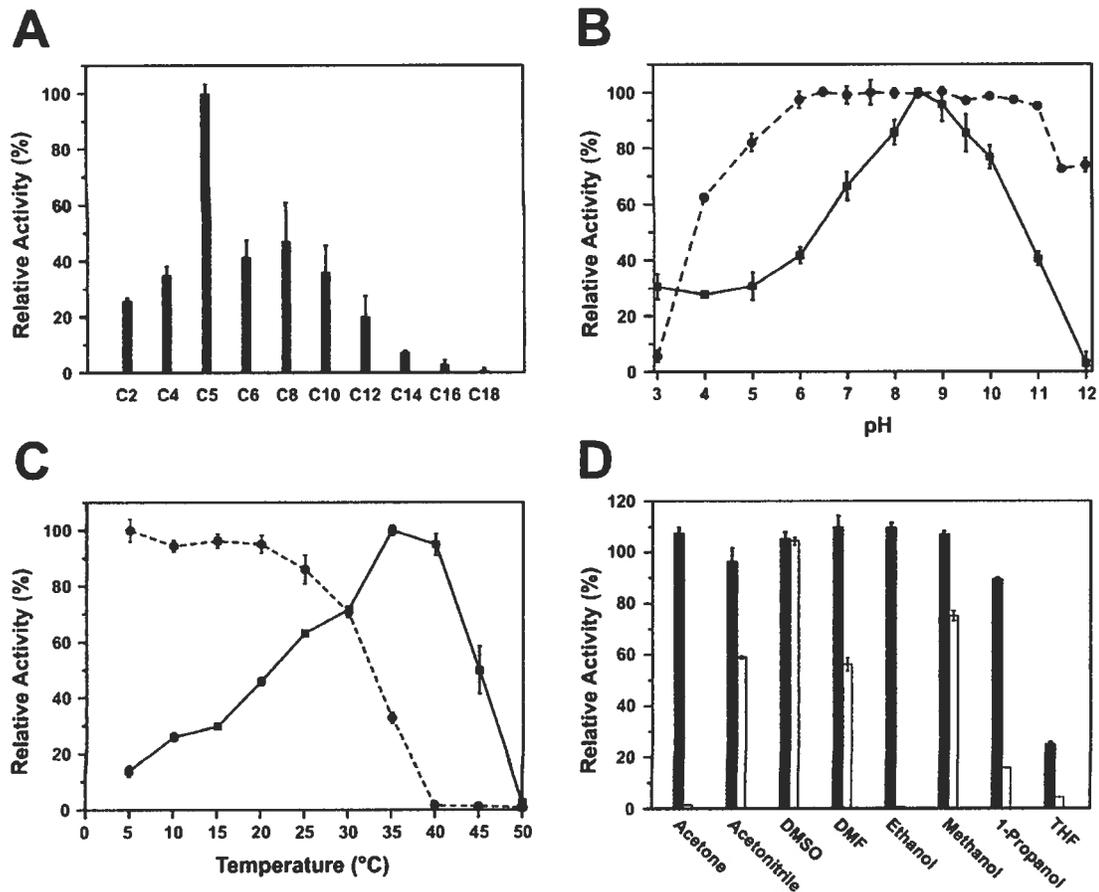


Figure 3. Effect of substrate, pH, temperature and organic solvents on EstC activity. A) Substrate discrimination by EstC. Enzyme activities are expressed relative to an optimal activity observed with substrate *p*NP-C5 (100% = 6.0 ± 0.2 U/mg). B) Effect of pH on EstC activity. The solid line (squares) represents relative activity as a function of pH. The dashed line (circles) represents the residual activity after a 1-hour preincubation of the enzyme at various pH values. Enzyme activities are expressed relative to a maximal activity observed at pH 8.5. C) Effect of temperature on EstC activity. The solid line (squares) represents relative activity as a function of temperature. The dashed line (circles) represents the residual activity after a 1-hour preincubation of the enzyme at various temperatures. Values are expressed relative to a maximal activity observed at 35°C. D) Effect of organic solvents on EstC activity. Solid bars represent the residual activity after a 1-hour pre-incubation of the enzyme in 10% (v/v) of each organic solvent. Open bars represent residual activity after a 1-hour pre-incubation in 30% (v/v) of each organic solvent. Activities are calculated relative to a control enzyme incubated in the same conditions without organic solvent. doi:10.1371/journal.pone.0032041.g003

by *Aspergillus nidulans* WG312 [30,42]. Typically, enzymes from psychrophilic organisms display higher catalytic efficiencies between 0°C and 20°C rather than at mid-range or higher temperatures, but are susceptible to thermal denaturation even at medium temperatures (25–45°C) [39,43]. Thermal stability of EstC was assayed with a pre-incubation period of 1 hour at various temperatures. The enzyme was relatively susceptible to thermal denaturation, showing a gradual loss of activity above 25°C and nearly no residual activity after 1 hour at only 40°C, suggesting it really is a cold-active enzyme (Figure 3C). These results show that EstC is more heat-labile than its *S. coelicolor* cytoplasmic counterpart EstB [23]. Nevertheless, the specific activity of EstC toward *p*NP-C5 was 4-fold higher at 10°C than the specific activity measured for EstB under the same conditions

(Figure S1). These results suggest that EstC could be an interesting candidate for applications requiring cold conditions such as oil-contaminated soil bioremediation and biosynthesis of fragile pharmaceutical compounds.

Incubation with various water miscible organic solvents showed that EstC is remarkably tolerant to low concentrations of protein denaturants such as acetonitrile, dimethyl formamide (DMF), and primary alcohols (Figure 3D). Similar solvent tolerance was found with the cold-active LipP of *Pseudomonas* sp. (strain B11-1), but EstC showed greater tolerance to various concentrations of acetonitrile [29]. However, EstC was sensitive to tetrahydrofuran (THF) in both low (10% v/v) and medium concentration (30% v/v). The enzyme was also sensitive to all solvents in medium concentration, except for dimethyl sulfoxide (DMSO). In fact, pre-

incubation of the enzyme with low concentrations (10% v/v) of acetone, DMF, DMSO, methanol and ethanol increased its activity, a phenomenon observed with many lipolytic enzymes such as LipP and a cold-active lipase from *Aeromonas* sp. LPB 4 [29,44,45]. The activation of EstC by DMSO and other organic solvents is an interesting feature for organic synthesis applications [46].

The effect of pre-incubation of various metal ions and chemicals on enzyme activity was also investigated (Table 1). The results showed no stimulation by any of the divalent cations tested. Ca^{2+} and Mg^{2+} had no significant impact on enzyme activity, but significant inhibition was observed with Cu^{2+} , Fe^{2+} and Mn^{2+} at 10 mM concentration (Table 1). Co^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} had a strong negative effect on enzyme activity at 1 mM, suggesting that these metals could be potent inhibitors. However, there were no effect on enzyme activity upon incubation with the metal chelators EDTA and EGTA, suggesting that EstC does not rely on any metal cofactor for activity. These results are in agreement with the fact that lipases and esterases generally do not require cofactors for catalysis [47]. Incubation with 10 mM DTT reduced enzyme activity by 40%, a sharp contrast relative to the activation effect reported for EstB in similar conditions [23]. The mature protein sequence of EstC contains only one cysteine residue, thus precluding the formation of any disulfide bridge, which is consistent with the relatively weak impact of DTT on enzyme activity. The absence of disulfide bridges is common among cold-active enzymes and could explain their inherent thermostability [28]. In contrast, the serine hydrolase inhibitor PMSEF only reduced enzyme activity by 18% at 1 mM, showing that EstC is remarkably tolerant to this inhibitor. PMSEF most likely binds to the catalytic serine nucleophile, confirming that EstC is a serine hydrolase like other lipolytic enzymes [3].

To evaluate the potential of EstC in ester synthesis, kinetic parameters of the enzyme were assessed with various short chain p NP-esters (C2 to C8) and TAGs (C2:0 and C4:0). At high substrate concentrations, both EstB and EstC showed clear substrate inhibition for all the p NP esters tested, results that directly correlated with the length of the acyl chain (results not shown). Increasing the surfactant concentration 5- and 10-fold did not reduce this phenomenon. As a result, kinetic parameters are reported for substrate concentrations where the enzyme displays Henri-Michaelis-Menten behavior. The kinetic parameters of EstC are summarized in Table 2. The K_m values decrease as the acyl chain length increases for substrates C2 to C8, with very similar values for p NP-C6 and p NP-C8. Our results show that EstC has the strongest affinity toward p NP-C6 ($K_m = 0.071 \pm 0.004$ mM). However, k_{cat} for this substrate is the lowest of the p NP esters tested. EstC displays much lower affinity for p NP-C2 than EstB ($K_m = 0.89 \pm 0.06$ mM) and EstA ($K_m = 1.71 \pm 0.02$ mM), but greater affinity toward C4 to C8 acyl chains [23,24]. In fact, catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) is highest toward p NP-C5 (737 ± 77 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$), in agreement with the results obtained for substrate specificity (Figure 2A). The k_{cat} values of EstC toward short-chain p NP esters and triglycerides are comparable to those of the cold-active esterases of *Psychrobacter* sp. Ant300 and *Psychrobacter* sp. TA144 (formerly *Moraxella* sp. TA144) [48,49]. These results suggest that EstC could be a very useful biocatalyst for the industrial synthesis of volatile short chain esters such as ethyl butyrate and ethyl valerate, two important flavor esters [50]. Enzyme specificity toward short-chain triglycerides was also assessed. In the conditions tested, EstC showed a very low affinity toward glyceryl triacetin (C2:0), with a very high K_m of 90 ± 1 mM. To our knowledge, no such low affinity has ever been reported for cold-adapted esterases [28]. Nevertheless, k_{cat}

Table 1. Effect of metal and potent inhibitor concentrations on the activity of purified EstC.

Compound ^a	Concentration (mM)	Residual activity (% \pm SD) ^b
Control	0	100 \pm 3
CaCl_2	1	88 \pm 1
	10	92 \pm 3
CoCl_2	1	56 \pm 1
	10	24 \pm 5
CuCl_2	1	75 \pm 0.1
	10	26 \pm 4
FeCl_2	1	83 \pm 0.3
	10	8 \pm 3
MgCl_2	1	93 \pm 0.6
	10	96 \pm 3
MnCl_2	1	88 \pm 1
	10	79 \pm 1
NiCl_2	1	39 \pm 5
	10	10 \pm 0.2
ZnCl_2	1	18 \pm 1
	10	7 \pm 0.1
EDTA	1	95 \pm 0.7
	10	98 \pm 3
EGTA	1	95 \pm 1
	10	94 \pm 3
DTT	1	92 \pm 2
	10	62 \pm 2
PMSEF	1	82 \pm 0.3
	10	10 \pm 4

^aAll compounds were diluted in 50 mM Tris-HCl pH 8.5. An aliquot of the enzyme was incubated for 1 hour at 25°C with the buffer containing 1 or 10 mM of the compound. Values are expressed relative to a control without compound incubated in the same conditions.

^bResidual activity was measured using p NP-C5 as substrate at a temperature of 35°C. The pre-incubated enzyme was diluted 10-fold before being used in standard assays. Residual activity was expressed relative to the activity measured with the control.

doi:10.1371/journal.pone.0032041.t001

toward this substrate was also very high, suggesting that EstC could be used at very high substrate concentrations for bioconversion of short chain triglycerides into valuable esters. It is well known that temperature can influence substrate affinity of an enzyme [29]. Quantification of the effect of temperature on the Michaelis constant of EstC could highlight better conditions to favor the enzyme affinity toward short chain triglycerides. Nevertheless, the enzyme showed much better affinity toward glyceryl tributyrin (C4:0), displaying a K_m value comparable to that of *PsyHISL* of *Psychrobacter* sp. Ant.300 ($K_m = 0.115 \pm 0.30$ mM) [49]. However, the relatively low k_{cat}/K_m values of EstC toward short chain triglycerides suggest they might not be natural substrates of the enzyme.

While EstC is not the most efficient lipolytic enzyme at very low temperatures, it still demonstrates unique features that deserve further consideration for cold-adapted industrial processes. The industrial use of cold-active esterases and lipases requires an easy and rapid production system that can generate very high yields of active enzyme in a short amount of time. Alas, most of the

Table 2. Kinetic parameters of recombinant EstC toward *p*-nitrophenyl short chain esters and triglycerides.

Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
<i>p</i> -nitrophenyl acetate (C2)	2.9±0.8	451±10	156±41
<i>p</i> -nitrophenyl butyrate (C4)	0.84±0.05	124±2	148±10
<i>p</i> -nitrophenyl valerate (C5)	0.27±0.03	199±6	737±77
<i>p</i> -nitrophenyl hexanoate (C6)	0.071±0.004	41±1	578±36
<i>p</i> -nitrophenyl octanoate (C8)	0.11±0.018	58±3	527±90
Glycerol triacetin (C2:0)	90±1	151±2	1.7±0.03
Glycerol tributyrin (C4:0)	0.62±0.3	14±1	23±12

Standard deviation was derived from two different experiments, each performed with three replicates.

doi:10.1371/journal.pone.0032041.t002

psychrophilic bacteria identified as sources of cold-active lipolytic hydrolases are slow growing and/or difficult to culture [28]. Additionally, industrial applications require high yield, economical and rapid purification steps that are easily amenable to the large-scale production of homogeneous and active biocatalysts. In addition to being inherently thermolabile, lipases and esterases from cold-adapted bacteria are notoriously difficult to purify due to the production of lipopolysaccharides that strongly associate with these lipolytic enzymes [28]. To overcome these issues, we developed an *E. coli* recombinant system that can achieve high yields of EstC production from simple LB medium growth at low temperature in only 24 hours. Under these conditions, the enzyme was overproduced as a cytoplasmic, soluble biocatalyst with yields exceeding 350 mg/L. Additionally, EstC was easily purified to near homogeneity from a fast, single-step IMAC with an average yield of 42.8±2.91 mg (average of three independent lots), confirming that the enzyme is an attractive candidate for large-scale production. This represents a considerable advantage over existing cold-active lipolytic enzymes isolated from mesophilic and psychrophilic organisms, the latter having failed to be purified to homogeneity to date [28]. As a result, EstC currently represents one of the fastest, easiest, and most efficient alternatives for the industrial production of cold-active esterases with high yields and high purity. Additionally, since EstC was isolated from a mesophilic organism, it remains relatively active and thermostable at higher temperatures, retaining more than 70% of its residual activity at temperatures up to 30°C. This represents a major advantage over lipolytic enzymes isolated from cold-adapted organisms [28]. Finally, high yields of intracellular EstC expression could provide a strong basis for the development of whole-cell industrial biocatalysts, potentially eliminating the need for cell lysis and purification steps altogether. A similar approach was recently

References

- Sharma D, Sharma B, Shukla AK (2011) Biotechnological approach to microbial lipase: a review. *Biotechnology* 10: 23–40.
- Sharma R, Chisti Y, Bauerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 19: 627–662.
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53: 315–351.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 763–781.
- Jaeger KE, Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13: 390–397.
- Arpigny JL, Jaeger KE (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343: 177–183.
- Verger R (1997) "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Tibtech* 15: 32–38.
- Fejan P, Jonson PH, Petersen MT, Petersen SB (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* 82: 1033–1041.
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA (1994) The sequence crystal structure determination and refinements of two crystal forms of lipase B of *Candida antarctica*. *Structure* 15: 293–308.
- Szajner H, Maliszewska I, Wiczyński J (1988) Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microb Technol* 10: 192–197.
- Gandolfi R, Marnetti F, Lazzarini A, Molinari F (2000) Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. *J Appl Microbiol* 89: 870–875.

developed by Wei and coworkers on a lipase from *Proteus* sp., whereby the enzyme was used as an efficient catalyst directly from the overexpressed *E. coli* BL21 (DE3) cells [51]. In this study, the recombinant cells were simply permeabilized with a detergent and used as whole-cell catalysts for the conversion of oils into biodiesel. We are currently investigating the feasibility of such an approach applied to the cold-active EstC.

Conclusion

Genome mining of intracellular lipolytic enzymes in *S. coelicolor* has led to the preliminary characterization of the gene product of SCO5165, a new cold-active esterase named EstC. Our results demonstrate that this enzyme is tolerant to alkaline pH and effective at medium to low temperatures. In agreement with the previously characterized intracellular esterase EstB, EstC shows good alcohol and solvent tolerance, in addition to displaying enhanced activity after pre-incubation with low concentrations of organic solvents. The enzyme also exhibits a higher specificity for shorter chain *p*NP esters (C4 to C8), suggesting it could be a serious candidate for ester synthesis in organic media. This further highlights the industrial potential of EstC for various biotechnological applications, an approach that we are currently investigating.

Supporting Information

Figure S1 Specific activities of EstB and EstC toward *p*NP-C5 at different temperatures. (TIF)

Table S1 Primers employed for amplification of ORFs coding for putative non-secreted lipolytic enzymes of *S. coelicolor* A3(2). (DOC)

Acknowledgments

The authors would like to thank Jeffrey W. Keillor (University of Ottawa) and Étienne Dubé (Immu-Science Canada) for helpful discussions, as well as Immu-Science Canada for technical support. G.B. acknowledges the support of a BMP Innovation scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fonds de Recherche en Santé - Nature et Technologies (FRQNT). N.D. acknowledges support from the FRQNT Strategic Cluster "Regroupement Québécois de Recherche sur la Fonction, la Structure et l'Ingénierie des Protéines" (PROTEO) and the FRQS Strategic Cluster "Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines" (GRASP).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GB FS YH FL ND. Performed the experiments: GB FL. Analyzed the data: GB FS YH FL ND. Contributed reagents/materials/analysis tools: FS YH FL ND. Wrote the paper: GB FL ND.

12. Lange KP, Mizajali M, Osborne M, Peacock LM, Zompaids V, et al. (1999) Lipase activity in streptomycetes. *Enzyme Microb Technol* 25: 569–575.
13. Sommer P, Bornmann C, Gutz F (1997) Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamonensis*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3533–3560.
14. Vujaklija D, Schroder W, Abramic M, Zou P, Lesic I, et al. (2002) A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces cinereus* GDS(L)-lipase gene. *Arch Microbiol* 178: 124–130.
15. Shin M, Kim W, Kim J (1997) Neutral lipids and lipase activity for actinorhodin biosynthesis of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biotechnol Lett* 19: 221–223.
16. Arbolaza A, Rodriguez E, Altabe S, Alvarez H, Gramajo H (2008) Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* 74: 2573–2582.
17. Alvarez HM, Steinbuechel A (2002) Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 367–376.
18. Popova NI, Krivova AI, Rastvishina IO, Burtseva SA (2005) Interrelation of the biosyntheses of lipids, lipoxigenase, and lipase in cultured streptomycetes. *Microbiology* 71: 717–719.
19. Ohkoshi ER, Packer NM (1991) Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* 140: 931–943.
20. Schamer C, Day A, Leblond A, Leblond P, Decaris B, et al. (1999) Modulation of lipid metabolism and spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambifaciens* unstable mutants. *Appl Environ Microbiol* 65: 2730–2737.
21. Bielec A, Cerkovic H, Long PF, Schwab H, Abramic M, et al. (2009) The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has arylesterase and a true lipase activity. *Biochimie* 91: 390–400.
22. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, et al. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141–147.
23. Soror SH, Verma V, Rao R, Rasool S, Koul S, et al. (2007) A cold-active esterase of *Streptomyces coelicolor* A3(2) from genome sequence to enzyme activity. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34: 525–531.
24. Soror SH, Rao R, Cullum J (2009) Mining the genome sequence for novel enzyme activity: characterisation of an unusual member of the hormone-sensitive lipase family of esterases from the genome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Protein Eng Des Sel* 22: 333–339.
25. Coté A, Shareck F (2008) Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme Microb Technol* 42: 381–388.
26. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: Foundation TJI, pp 613.
27. Diaz P, Prim N, Javier Pastorán FI (1999) Direct fluorescence-based lipase activity assay. *Biotechniques* 27: 696–700.
28. Joseph B, Rantke PW, Thomas G (2008) Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv* 26: 457–470.
29. Choo DW, Kurihara T, Suzuki T, Soda K, Esaki N (1998) A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol* 64: 486–491.
30. Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, Atomi H, Inanaka T (2001) Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microbiol* 67: 4064–4069.
31. Alquati C, Gioia LD, Santarossa G, Alberghina L, Fantucci P, et al. (2002) The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*: heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. *Eur J Biochem* 269: 3321–3328.
32. Jeon JH, Kim JT, Kim YJ, Kim HY, Lee HS, et al. (2009) Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Appl Microbiol Biotechnol* 81: 865–874.
33. Para LP, Reyes F, Acevedo JP, Salazar O, Andrews BA, et al. (2008) Cloning and fusion expression of a cold-active lipase from marine Antarctic origin. *Enzyme Microb Technol* 42: 371–377.
34. Ryu HS, Kim HK, Choi WC, Kim MH, Park SY, et al. (2006) New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 321–326.
35. Yang XX, Liu XZ, Fan TJ, Bian J, Huang XH (2004) Cloning and expression of *lipP*, a gene encoding a cold-adapted lipase from *Moritella* sp. 2-5-10-1. *Curr Microbiol* 56: 191–198.
36. Zhang P, Zeng R (2007) Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep-sea psychrotrophic bacterium. *J Microb Biotechnol* 17: 604–610.
37. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, et al. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5: 197–211.
38. Nuezheng L, Shuoshuo C, Guoying X, Shuai W, Ning D, et al. (2010) Cloning and heterologous expression of two cold-active lipases from the Antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. G. *Polar Res* 29: 421–429.
39. Roh C, Villate F (2008) Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organisms. *J Appl Microbiol* 105: 116–123.
40. Kim HK, Juang Y, Choo W, Ryu HS, Oh T, et al. (2001) Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiol Lett* 235: 349–355.
41. Zhang P, Zeng R (2006) Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep-sea psychrotrophic bacterium, *Psychrobacter* sp. 7195. *J Microb Biotechnol* 17: 604–610.
42. Mayordomo I, Raudel-Gil F, Prieto JA (2000) Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J Agric Food Chem* 48: 105–109.
43. Argyry JL, Feller G, Gerday C (1993) Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immunobilis* B10. *Biochim Biophys Acta* 1171: 331–333.
44. Lee MY, Dordick JS (2002) Enzyme activation for nonaqueous media. *Curr Opin Biotechnol* 13: 376–381.
45. Lee HK, Ahn MJ, Kwak SH, Song WH, Jeong BC (2003) Purification and characterization of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas* LPB 1. *J Microbiol* 11: 22–27.
46. Klibanov AM (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409: 241–246.
47. Jaeger KE, Reetz MT (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16: 396–403.
48. Kulakova L, Galkin A, Nakanaya T, Nishino T, Esaki N (2004) Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Am300: gene cloning, characterization, and the effect of Gly→Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim Biophys Acta* 1696: 59–65.
49. De Santi C, Tutino ML, Maudrich L, Giuliani M, Parrilli E, et al. (2010) The hormone-sensitive lipase from *Psychrobacter* sp. TA144: new insight in the structural/functional characterization. *Biochimie* 92: 949–957.
50. Alvarez-Mecarie E, Baratti J (2000) Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *J Mol Catal B Enzym* 10: 377–383.
51. Gao B, Su E, Liu J, Jiang Z, Ma Y, et al. (2009) Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Plutus* sp. for biodiesel production. *J Biotechnol* 139: 169–175.
52. Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205–217.
53. Poirot O, O'Toole E, Notredame C (2003) Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res* 31: 3503–3506.

2.5 Supplemental data

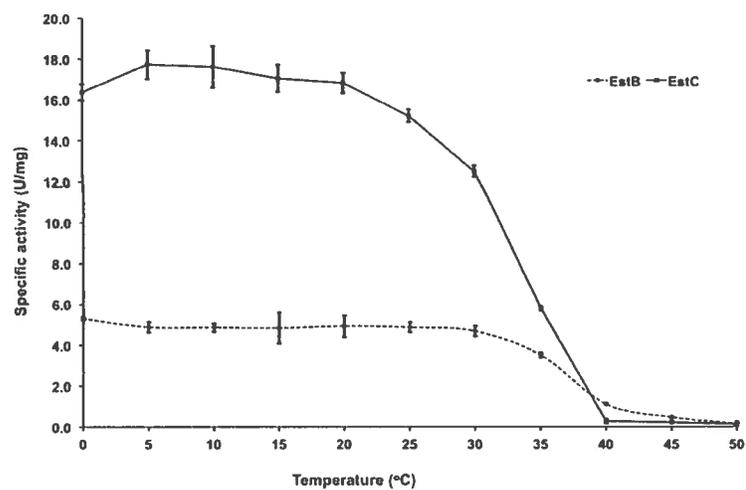


Figure S1. Specific activities of EstB and EstC toward *p* NP-C5 at different temperatures. (doi:10.1371/journal.pone.0032041.s001)

Table S1. Primers used for amplification of ORFs coding for putative non-secreted lipolytic enzymes of *S. coelicolor* A3(2).

Gene	Accession number	5' primer (<i>Nde</i> I)	3' primer (<i>Xho</i> I)
SCO1265	NP_625552	AAACATATGAGTTTCCTCAATCCC CGTATCCAG	ATTCTCGAGTCAGTCGGCCAGGG CCTTGAGGACTTC
SCO2123	NP_626380	ATTCATATGTCGGTCCTGCCCGGA GCCGAGCC	ATTCTCGAGTCAGCCACCTGCGGC CGTCCCTTC
SCO3644	NP_627838	AAACATATGCCGGACGCCGCCGC AGAACC	AAACTCGAGTCACCAGGCCAACT GCGCGATCTC
SCO4746	NP_628904	AAACATATGCACGTGAGCGAGAG CAACG	AATCTCGAGTCAGCCGGGCCCTG TGCTGCTGG
SCO5165 (<i>estC</i>)	NP_629313	AAACATATGGTGAGCAGGAACGC CGCCTTC	TTTCTCGAGTCAGCGCACGTACG
SCO6967 (<i>estB</i>)	NP_631032	AAACATATGGCCGAGGCCCGCGA GCACACG	ATTCTCGAGTCAGCGGGCGAGCA CGCCGTC
SCO7131 (<i>estA</i>)	NP_631192	AAACATATGAGCGACATCGTTCT CGAACC	ATACTCGAGTCAGTCGGTGCCGA GGGCACTG

2.6 Discussion

Le clonage hétérologue et l'expression recombinante de gènes de *S. coelicolor* codant pour des lipases/estérases présomptives ont permis d'identifier une nouvelle estérase mésophile qui reste active à basse température, l'estérase EstC. L'enzyme est facilement surexprimée chez *E. coli* et peut être purifiée par une simple chromatographie d'affinité. L'enzyme recombinante semblait très efficace envers les esters de *p*-NP à chaînes courtes avec des données cinétiques similaires à d'autres estérases psychrophiles caractérisées comme la LipoI de source inconnue [155]. Comparativement à une autre estérase intracellulaire de *S. coelicolor*, EstB, la protéine EstC s'est avérée presque trois fois plus active pour le même intervalle de température (Figure S1). Ceci suggère que EstC serait une meilleure candidate pour des applications industrielles que EstB, une enzyme qui a été présentée comme étant particulièrement intéressante pour ce type d'utilisation [142]. L'identification d'enzymes mésophiles actives à basse température est fréquente chez des organismes tel que *S. coelicolor* qui peut couramment rencontrer des températures inférieures à 10°C dans son biotope naturel [142, 156]. La capacité de EstC à pouvoir fonctionner à de basses températures permet d'envisager des applications où ce facteur est limitant comme la production de détergents agissant en eau froide ou la synthèse de composés organiques labiles [156]. Cependant, à la lumière des résultats de caractérisation obtenus, l'hypothèse de départ voulant que les enzymes intracellulaires puissent être capables de faire une réaction de synthèse organique d'intérêt industriel s'est avérée impossible à confirmer.

Bien que EstC présente aussi des caractéristiques intéressantes de tolérance aux pH et aux solvants organiques, deux exigences pour des applications industrielles, son efficacité enzymatique envers des triglycérides à chaînes courtes reste relativement faible comparativement aux lipases commerciales disponibles sur le marché. Par exemple, la lipase B commerciale de l'organisme psychrophile *Candida antarctica* a une activité de 70.4 U/mg envers la tributyrine (C4:0) [206] alors que EstC présentait une activité de

seulement 1.2 ± 0.4 U/mg dans des conditions similaires (G. Brault, résultats non-publiés). Ceci suggère que cette forme d'esters n'est probablement pas le substrat naturel de l'enzyme et donc que les applications potentielles impliquant des TAGs seraient somme toute limitées. D'ailleurs, son utilisation sous forme lyophilisée pour faire des réactions de synthèse de butyrate de méthyle (réaction de transestérification à 25°C) s'est avérée nulle (G. Brault, résultats non-publiés). Cette même forme réhydratée avait par contre une activité hydrolytique envers le même triglycéride. Ceci suggère que l'activité hydrolytique d'une estérase/lipase n'est pas toujours corrélée à sa capacité à effectuer la réaction inverse de synthèse. D'autres études tendent à confirmer cette absence de corrélation [207-209].

2.7 Résultats supplémentaires

L'article présenté portait sur la caractérisation biochimique d'un seul des 15 gènes sélectionnés (voir Annexe I). La présente section décrit les résultats obtenus pour les 14 autres gènes et explique en partie le choix de la caractérisation de la protéine EstC. Elle explique aussi les limites du système recombinant employé et décrit l'approche préconisée pour cribler la banque de protéines lipolytiques issue de l'étude du génome de *S. coelicolor*.

Les gènes SCBAC25F8.05c et I11.14c ont précédemment été exprimés avec succès chez *S. lividans* [197, 198]. Même si les enzymes produites présentaient des caractéristiques intéressantes d'un point de vue industriel, les niveaux d'expression étaient trop faibles pour envisager d'éventuelles applications (~23 et 30.4 µg/mL pour les protéines SCBAC25F8.05c et I11.14c, respectivement [198]). Aussi, il a été décidé d'employer l'hôte *E. coli* pour effectuer le criblage et la surexpression de l'ensemble des gènes lipolytiques de *S. coelicolor* sélectionnés. Cet hôte a été choisi pour sa rapidité de croissance, sa simplicité de culture, sa capacité à surproduire des protéines recombinantes et les nombreux outils moléculaires disponibles [210]. De plus, plusieurs gènes de *S.*

coelicolor ont été exprimés avec succès chez cet hôte hétérologue incluant des gènes lipolytiques [142, 143, 199]. Les gènes codant pour des protéines sécrétées chez *S. coelicolor* ont été clonés sans leur peptide signal de sécrétion afin de pouvoir exprimer des protéines marquée avec une étiquette hexa-histidines à l'extrémité N-terminale. Le criblage fonctionnel de ces clones n'a donné aucune activité hydrolytique significative sur les géloses tributyrine (voir Annexe II). Néanmoins, une très faible activité lipolytique a été observée sur les géloses contenant du glycéryl trioctanoate (C8 :0) pour les clones SCBAC25F8.05c, SCD63.10c, SCF34.09, et SCF42.23c (Annexe II). Une faible activité a aussi été observée sur les géloses contenant de l'huile d'olive (simulant la trioléine, C18 :1) pour les protéines SCBAC25F8.05c, SCD63.10c et SCE8.12c (Annexe II). Ceci semble confirmer que les enzymes produites de façon cytoplasmique chez *E. coli* sont actives et seraient, *a priori*, des lipases plutôt que des estérases. Il est cependant possible que l'absence d'activité hydrolytique sur milieu tributyrine soit attribuable au fait que de la rhodamine B ait été ajoutée seulement pour les autres types de géloses, ce qui augmente substantiellement la sensibilité des zymogrammes par rapport à ceux faits sans ce colorant.

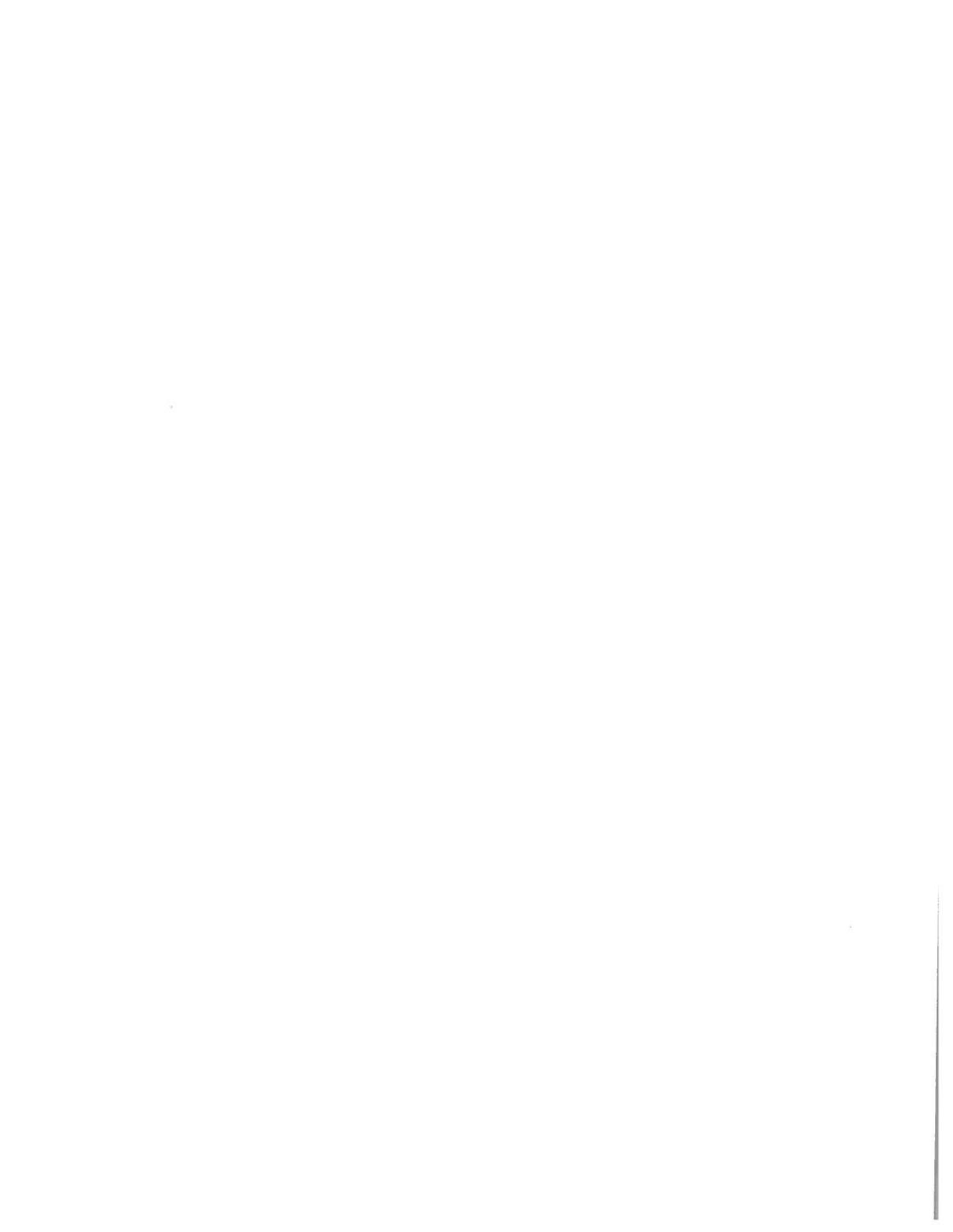
Afin de visualiser les niveaux d'expression recombinante, les fractions protéiques cytoplasmiques des clones ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) (Annexe III). Les patrons d'expression diffèrent largement des résultats anticipés à partir des géloses sélectives. Les gènes SC2G18.12c, SC4B10.32, et SC6F7.19c sont surexprimés sous forme soluble. Par contre, seules SC6F7.19c (EstB) et SCH10.32c ont vraiment une activité hydrolytique envers le butyrate de méthylumbellyfèrone (MUF-butyrate) employé. Les protéines SCF51.05, SCF42.23c et SC111.24c sont aussi présentes en très forte concentration, mais sous forme de corps d'inclusions. Fait intéressant, la fraction correspondant aux corps d'inclusions du clone SCF42.23c présente une forte activité biologique (Annexe III). Des résultats similaires ont été obtenus pour les protéines SC6G4.24 et SCP8.28c (Annexe III). Il est généralement admis que les protéines emmagasinées sous forme de corps d'inclusion sont

biologiquement inactives, mais plusieurs études récentes ont rapporté le contraire [211]. L'utilisation de corps d'inclusion actifs pourrait même être une approche novatrice d'immobilisation d'enzymes pour produire des biocatalyseurs industriels [212]. Les très fortes concentrations cytoplasmiques de la protéine recombinante SCF42.23c pourraient servir de base pour la production d'un tel biocatalyseur.

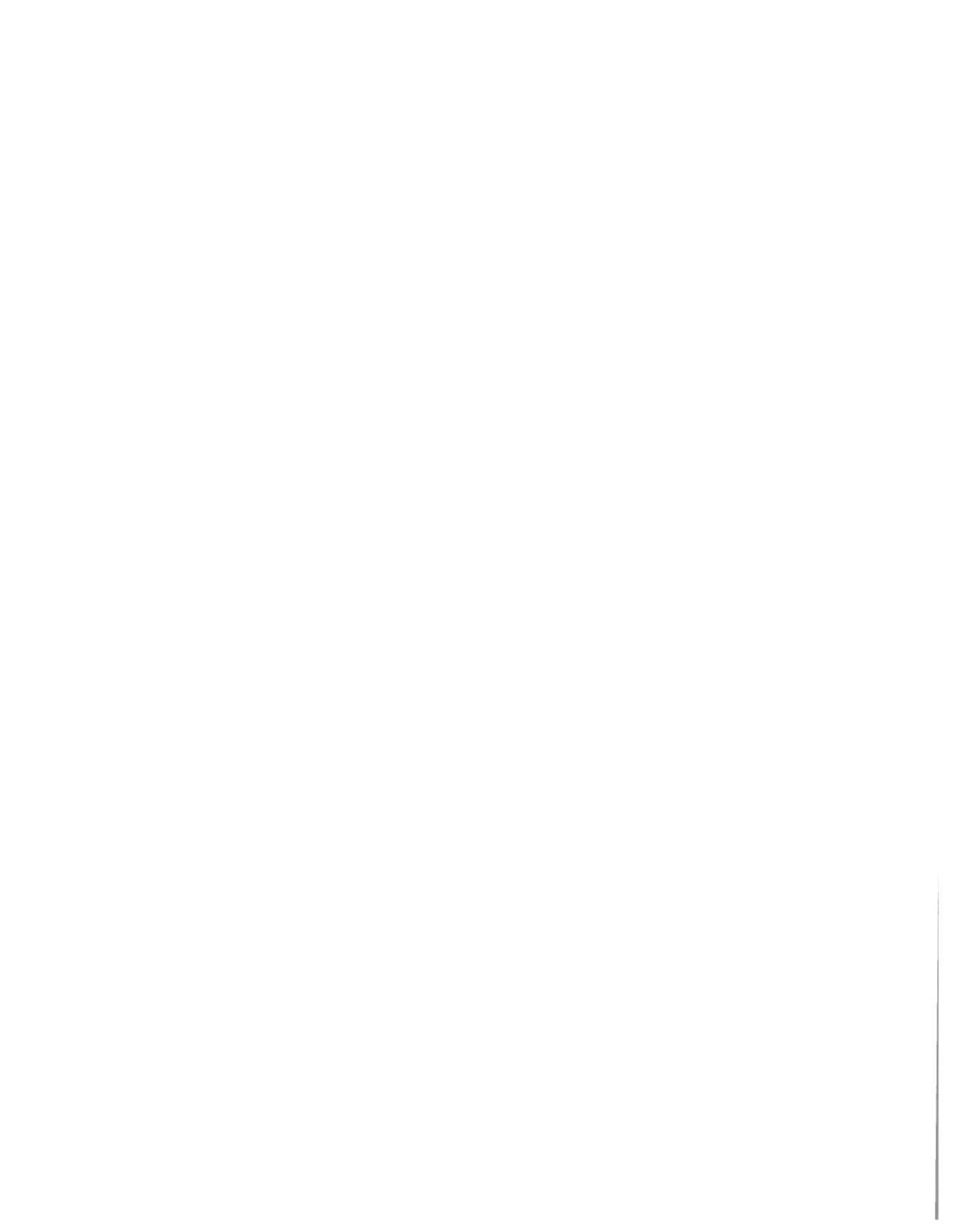
Bien que l'expression hétérologue chez *E. coli* se soit avérée efficace pour les protéines SC2G18.12c, SC4B10.32, SC6F7.19c (EstB), SCH10.32c et SCP8.28c (EstC), globalement, les activités observées lors de ce criblage initial sont relativement faibles. Dans le cas des protéines SCBAC25F8.05c et 111.14c, elles semblent même différer de ce qui a été rapporté dans la littérature [197, 198]. L'expression extracellulaire de ces protéines chez *S. lividans* avait permis de détecter leur présence sur différents milieux indicateurs incluant la tributyrine [198]. Ceci suggère que l'activité de ces protéines chez *E. coli* est beaucoup plus faible, probablement à cause de problèmes de repliement ou de modifications post-traductionnelles comme la formation de ponts disulfures [213, 214]. L'utilisation de l'hôte hétérologue *S. lividans* pour l'expression cytoplasmique des gènes sélectionnés s'est avérée infructueuse (G. Brault, résultats non-publiés). Aucun des gènes exprimés chez cet hôte n'a donné de protéines solubles et actives, y compris pour les gènes codant pour des protéines identifiées comme étant intracellulaires. D'autres modèles recombinants pourraient cependant être employés. L'expression hétérologue chez les levures *S. cerevisiae* et *P. pastoris* est très employée par les industries biotechnologiques [98, 215]. Les levures peuvent être cultivées rapidement dans des milieux simples et peu coûteux et ce, à de très hautes densités cellulaires [97]. Les niveaux d'expression sont souvent très élevés et peuvent atteindre plusieurs grammes par litre dans le cas de certaines protéines procaryotes [216]. Les protéines recombinantes peuvent être efficacement sécrétées et la machinerie cellulaire eucaryote est plus performante pour effectuer des modifications post-traductionnelles comme la formation de ponts disulfures. Bien que l'optimisation des biais de codons soit souvent nécessaire,

l'expression efficace de gènes de streptomycètes à forte proportion en bases G+C reste tout de même possible [217-219].

En conclusion, le criblage des 15 protéines de *S. coelicolor* sélectionnées pour une expression hétérologue chez *E. coli* n'a pas permis d'identifier des enzymes ayant un potentiel d'application industrielle. Les niveaux d'expression et/ou les activités spécifiques observées étaient relativement faibles et suggéraient la nécessité d'effectuer des travaux d'optimisation des systèmes d'expression. Conséquemment, il a été décidé de d'étudier d'autres lipases candidates provenant d'une banque métagénomique plutôt que d'essayer de créer de nouveaux systèmes de surexpression hétérologue pour ces protéines.



Chapitre 3. Deuxième article scientifique



3.1 Préface au chapitre

3.1.1 Les lipases provenant d'une étude métagénomique

La métagénomique est une approche très efficace pour l'identification de nouvelles enzymes lipolytiques. L'utilisation d'une étape d'enrichissement d'un échantillon biologique permet d'augmenter la proportion des micro-organismes adaptés à des conditions particulières [157, 159]. Une telle approche a été appliquée dans une étude antérieure à cette thèse afin de trouver des lipases thermostables et alcalino-tolérantes [160]. Un bioréacteur employant uniquement de l'huile d'olive comme source de carbone a été inoculé avec un échantillon de biomasse provenant de la cafétéria de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Des cycles d'augmentation de la température de 50 à 70°C avec des augmentations concomitantes du pH de 7 à 8.5 ont été appliqués pendant trois mois afin de favoriser la croissance d'organismes lipolytiques thermophiles. Le criblage de la banque métagénomique issue de la biomasse enrichie a permis d'identifier cinq nouvelles enzymes lipolytiques (Tableau VI, Annexe IV). Les gènes identifiés étaient riches en bases G+C (entre 64.3 et 69.9%) et ont donc été clonés chez *S. lividans* pour une expression hétérologue et une caractérisation biochimique dans deux études antérieures aux travaux présentés dans ce document [160, 162]. La caractérisation initiale de ces enzymes avec des substrats artificiels (esters de *p*-NP) a prouvé que les gènes identifiés codaient bien pour des lipases. Les enzymes testées présentaient une activation interfaciale et une activité significative pour les chaînes acyles de 14 carbones et plus, deux critères discriminant les vraies lipases des estérases [73]. Les séquences identifiées des lipases sont toutes d'origine inconnue et ont relativement peu d'homologie avec des séquences déposées dans les banques génomiques non-redondantes [147, 160, 162]. Avec une température optimale de 60°C, les lipases LipIAF1-6 et LipIAF5-2 semblent particulièrement intéressantes pour la synthèse de biodiesel qui se fait généralement à des températures avoisinant les 50-70°C [6, 76]. De plus, LipIAF5-2 a démontré une remarquable thermostabilité et une activité résiduelle identique au contrôle après 4 heures d'incubation à 90°C. La thermostabilité de LipIAF1-6 est moindre avec 20% d'activité

résiduelle après 30 minutes à la même température. Néanmoins, LipIAF1-6 a démontré une remarquable résistance aux alcools primaires, avec une augmentation de son activité enzymatique en présence de 30% (v/v) de méthanol et d'éthanol et plus de 95% d'activité résiduelle en présence de 30% (v/v) de 2-propanol [220]. L'incubation de la protéine LipIAF5-2 en présence de 30% (v/v) d'alcools primaires pendant 1 heure a montré une très forte augmentation de son activité spécifique, sauf pour le méthanol (Tableau 3.1). Ceci est particulièrement intéressant pour des applications de synthèse comme le biodiesel, des biolubrifiants ou des arômes divers. Le spectre d'activité de LipIAF1-6 est particulièrement large et représentatif des lipases, avec une activité spécifique de 4287 UI/mg envers le *p*NP-butyrates (C4 :0), 2974 UI/mg envers le *p*NP-caproate (C10 :0) et 2145 UI/mg envers le *p*NP-stéarate (C18 :0) [220]. Celui de la protéine LipIAF5-2 était plus spécifique envers les chaînes acyles de 14 carbones et plus avec une activité maximale de 160 UI/mg envers le *p*NP-myristate (C14 :0) [160]. La protéine LipF5-11 avait une spécificité envers les esters avec des chaînes acyles de 10 carbones et plus [147]. Ces résultats de caractérisation préliminaire semblaient indiquer que les lipases identifiées lors du criblage de banques métagénomiques enrichies sont de bonnes candidates pour des applications industrielles. Cependant, la caractérisation de ces enzymes avec des substrats naturels comme des triglycérides restait à accomplir afin de pouvoir bien évaluer leur potentiel de synthèse organique.

Tableau 3.1. Activités relatives de la LipIAF5-2 en présence de différents alcools. Adapté de [221].

Alcool	Activité relative (%) ⁽¹⁾
Méthanol	85 ± 12
Éthanol	517 ± 44
Propanol	281 ± 12
<i>sec</i> -propanol	481 ± 14
Butanol	240 ± 8
<i>sec</i> -butanol	315 ± 23
<i>sec</i> -pentanol	140 ± 20
Hexanol	34 ± 13
Glycerol	83 ± 22

⁽¹⁾ Activités hydrolytiques résiduelles exprimées par rapport à un contrôle incubé dans les mêmes conditions sans alcool.

Les enzymes LipIAF1-6 et LipIAF5-2 ont été produites sous forme extracellulaire avec des rendements avoisinant les 10 mg/L [160, 220]. La lipase LipIAF1-6 a toutefois été immobilisée efficacement par adsorption sur de la terre diatomée et par liaison covalente sur de la silice aminée en présence de glutaraldéhyde. Les activités spécifiques de 427 IU/mg de support et 235 IU/mg de support ont été déterminées pour l'adsorption et l'immobilisation covalente respectivement. Cependant, aucune activité de synthèse n'a été tentée avec ces biocatalyseurs immobilisés [220]. Aucune immobilisation n'a été tentée à l'époque pour la lipase LipIAF5-2. Le gène *lipIAF1-6* a aussi été cloné chez *E. coli* BL21 (DE3) à l'aide du plasmide pIAF841 et une construction avec le plasmide pUC18 contenant le gène *lipIAF5-2* a également été introduite chez *E. coli* DH11S. L'expression de ces gènes clonés avec leurs séquences codant pour les peptides de sécrétion a donné des niveaux de protéines recombinantes encore plus faibles que ceux rapportés chez *S. lividans* [220, 221]. L'expression extracellulaire de la protéine LipF5-11 chez *E. coli* TOP10 (Invitrogen) s'est avérée tout aussi faible [147]. Au final, malgré

l'utilisation de deux systèmes recombinants d'expression extracellulaire, il reste que les niveaux de production des enzymes recombinantes des systèmes testés étaient beaucoup trop faibles pour envisager toute application industrielle.

3.1.2 L'immobilisation intracellulaire

Le développement d'un système d'expression recombinante s'avère donc essentiel pour pouvoir employer ces lipases. Ce système devrait produire les enzymes en quantité suffisante et qui plus est, sous une forme minimisant les coûts associés à leur immobilisation. L'immobilisation en cellules entières est l'une des approches permettant de répondre à ces deux problématiques. L'efficacité de cette approche réside dans le fait qu'il suffit de cultiver les micro-organismes producteurs des enzymes recombinantes et de récupérer la biomasse pour effectuer des réactions de synthèse industrielle [103, 120]. Les étapes de production extracellulaire, de purification et d'immobilisation des enzymes qui sont à l'origine du coût non-concurrentiel des lipases sont contournées par l'expression à l'intérieur ou à la surface des cellules [72, 120, 222]. Bien que l'expression de surface semble efficace, il reste que cette approche semble encore en être qu'au stade expérimental [121, 223]. L'expression de surface est associée à diverses problématiques comme la quantité de protéines exprimées, la perturbation de l'intégrité membranaire et, dans le cas des lipases, à des problèmes de polarité des composantes extracellulaires avoisinantes [138, 224]. D'ailleurs, l'utilisation industrielle de cellules entières comme biocatalyseurs s'effectue surtout *via* l'utilisation de cellules vivantes ou mortes exprimant des enzymes intracellulaires [103]. Le développement de systèmes lipolytiques intracellulaires à des fins de synthèse organique a surtout été entrepris pour les hyphomycètes comme *R. oryzae*, *A. oryzae* et *R. chinensis* [112, 120]. L'utilisation de *E. coli* reste encore relativement marginale en raison de problèmes associés avec la production de protéines hétérologues sous forme soluble et active, surtout les enzymes nécessitant des modifications post-traductionnelles comme la formation de ponts disulfures [225]. Cependant, Wei et collaborateurs ont réussi à produire un biocatalyseur très efficace pour la production de biodiesel en exprimant une lipase hétérologue

intracellulaire chez *E. coli* BL21 (DE3) [106]. Récemment, Li et collaborateurs ont utilisé la même approche pour l'immobilisation de la lipase SML de *Serratia marcescens*. L'expression hétérologue intracellulaire chez *E. coli* s'est même avérée plus performante que l'expression homologue de cette protéine extracellulaire et a permis de synthétiser efficacement du biodiesel [107]. La même équipe de recherche a poussé l'audace jusqu'à co-exprimer de façon cytoplasmique les lipases commerciales CALB et TLL [105]. La simplicité et l'efficacité de ce système suggèrent que l'expression intracellulaire chez *E. coli* peut être employée pour la biocatalyse industrielle.

3.1.3 La biosynthèse d'arômes et fragrances

Les arômes et fragrances sont souvent constitués d'esters volatiles de très grande importance pour les industries alimentaires, de la parfumerie, des cosmétiques, de la pharmaceutique et des produits ménagers [226]. En Amérique du Nord, les arômes sont classés en deux catégories; les arômes naturels et artificiels. Les arômes dits artificiels regroupent l'ensemble des molécules de synthèse qui peuvent être retrouvées dans la nature et d'autres molécules entièrement créées par l'Homme. En Europe, une distinction plus poussée ajoute la classe des «arômes identiques naturels» qui regroupe toutes les molécules obtenues par synthèse et qui sont chimiquement identiques aux molécules naturelles. La classification naturelle est très importante car la demande mondiale pour cette classe de composantes est très forte et dicte la valeur marchande [226, 227]. Cependant, l'extraction de ces molécules de source biologique est souvent très onéreuse étant donné leur faible concentration relative dans les biomasses naturelles [228]. Selon les normes en vigueur, une molécule peut être étiquetée en tant que «naturelle» si elle provient exclusivement de la transformation physique, microbiologique ou enzymatique d'une matière première animale ou végétale [229, 230]. En moyenne, la valeur des arômes naturels est augmentée par un facteur d'ordre 2 par rapport aux arômes artificiels, mais dans certains cas cette plus-value peut être beaucoup plus grande. Par exemple, la vanilline artificielle vaut environ 15\$/kg alors que sa version naturelle pure vaut plus de

1500\$/kg, une valeur cent fois plus élevée pour des molécules chimiquement identiques [231].

Les arômes et fragrances peuvent être produites *de novo* par fermentation ou bien par bioconversion de précurseurs à l'aide de micro-organismes [227, 228]. Par exemple, la production biotechnologique de la vanilline peut se faire par fermentation de l'acide férulique *via* des souches résistantes de *Pseudomonas* [227]. Néanmoins, il arrive très souvent que les substrats et les produits de ces fermentations soient toxiques pour les cellules vivantes, ce qui limite grandement les rendements de production [227]. La synthèse abiotique d'esters en milieu organique *via* l'utilisation de lipases est une approche permettant de contourner cette problématique. L'utilisation d'enzymes permet de synthétiser plus efficacement ces molécules dans des conditions douces, sans sous-produits et avec la possibilité d'y apposer un label naturel [228, 232]. De plus la stéréosélectivité des lipases permet la résolution chirale de certaines molécules dont le pouvoir aromatisant ou la toxicité varie en fonction de l'énantiomère [232]. Par exemple, seul l'énantiomère (*S*) du (*R,S*)-2-méthylbutanoate d'éthyle possède la saveur distincte de pomme et de verdure [233]. La synthèse enzymatique d'esters est souvent effectuée en présence de co-solvants comme l'hexane, l'heptane ou de l'acétone [226, 228]. L'utilisation de solvants organiques assure une homogénéité des substrats, qui sont souvent hydrophobes et parfois immiscibles. Alternativement, il est possible d'employer les réactifs comme solvants. Par exemple, pour la synthèse de salicylate de méthyle, il est possible de dissoudre l'acide salicylique dans l'alcool sans ajouter de co-solvant. Bien qu'efficace, il n'en demeure pas moins que les systèmes sans co-solvants ont souvent des rendements inférieurs en raison de problèmes de transfert de masse et la formation de systèmes biphasiques [234]. Néanmoins, du point de vue de la sécurité alimentaire, l'absence de co-solvants est à favoriser en raison de leur inhérente toxicité. L'une des solutions avancées est l'emploi de CO₂ supercritique (SC-CO₂) comme solvant écologique et sécuritaire pour la production enzymatique d'arômes [1, 233, 235, 236]. Le CO₂ se comporte comme un liquide en conditions supercritiques de pressions au dessus de

73,8 bars et de températures supérieures à 31,1°C. Il diffuse par contre comme un gaz et s'évapore complètement une fois la réaction terminée [236]. Bien qu'efficace, l'utilisation industrielle du SC-CO₂ demeure limitée en raison du coût des équipements spécialisés nécessaires, mais cette approche semble tout de même des plus prometteuse [228].

3.1.4 Objectifs et hypothèses

L'objectif principal présenté dans ce chapitre est la production d'un système de surexpression et d'immobilisation simple pour les lipases identifiées et caractérisée dans l'étude métagénomique antérieure mentionnée précédemment (voir section 3.1.1). Il est à noter que cette étude ne fait pas partie intégrante des travaux présentés dans cette thèse. Notre hypothèse est que la production intracellulaire de lipases recombinantes s'avère un moyen simple et efficace pour immobiliser des lipases capables d'effectuer des réactions de synthèse organique. Pour ce faire, les séquences primaires des lipases ont été analysées grâce au serveur SignalP 4.1 afin d'identifier la présence de séquences de sécrétion. Les gènes ont ensuite été clonés sans ces séquences dans le but d'exprimer des protéines marquées par une étiquette hexa-histidines à l'extrémité N-terminale. Ceci permettra de faciliter leur purification en vue des tests de caractérisation biochimique. Le criblage initial de la lipase LipIAF5-2 en présence de substrats naturels suggérait une forte affinité pour les triglycérides à chaînes courtes. Il a donc été décidé d'optimiser ce biocatalyseur pour la synthèse d'esters à chaînes courtes qui s'avèrent être des molécules hautement prisées pour leurs propriétés aromatisantes.

3.1.5 Présentation du 2^e manuscrit

Le manuscrit scientifique intitulé «Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *E. coli* whole-cell catalyst expressing a newly characterized heterologous lipase» a été soumis à la revue PLoS ONE (www.plosone.org; facteur d'impact de 3.730 en date de juin 2013) et publié en ligne le 26 mars 2014 dans le numéro 3 du volume 9 de la revue avec le numéro d'accèsion électronique e91872 et le doi:

10.1371/journal.pone.0091872. eCollection 2014. La version PDF publiée sur le site de PLoS ONE est présentée dans ce document. L'article scientifique constitue une étude de caractérisation biochimique du biocatalyseur produit par l'expression intracellulaire de l'enzyme LipIAF5-2 chez *E. coli* dans le but de synthétiser des esters volatiles ayant des propriétés aromatisantes.

3.2 Contribution des auteurs

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été entièrement réalisés par l'étudiant sous la supervision de F. Shareck et de N. Doucet. Le manuscrit a été rédigé en majorité par l'étudiant et N. Doucet. Il a été révisé par F. Shareck, F. Lépine et Y. Hurtubise (superviseur industriel).

3.3 Résumé

Les esters de faible poids moléculaire sont généralement très volatiles et ont des propriétés aromatisantes agréables qui rappellent les fruits et les fleurs. Ces esters sont produits artificiellement ou extraits de sources naturelles à grands frais. Il est cependant possible de les produire de façon «naturelle» en employant des biocatalyseurs comme des lipases et des estérases. Le gène codant pour une nouvelle lipase (LipIAF5-2) identifiée lors d'une étude métagénomique antérieure a été cloné et la protéine surexprimée chez *E. coli*. En employant les cellules entières de cet hôte hétérologue comme biocatalyseur, plusieurs esters volatiles ont pu être synthétisés par estérification et transestérification en milieu organique. La lipase recombinante a démontré une bonne affinité envers les triglycérides d'acide octanoïque, mais l'activité maximale a été observée pour la transestérification de la triacétine avec du méthanol comme accepteur d'acyle. Une simple étape de perméabilisation des cellules au bromure de cétyle-triméthylammonium a permis d'augmenter l'activité synthétique d'au moins six fois. L'activité optimale a été observée avec une concentration de 10% (p/p) en eau et une température de 40°C en présence de *tert*-butanol. Le biocatalyseur s'est avéré très résistant à la dénaturation par

les alcools primaires, les acides carboxyliques à chaînes courtes en plus d'être thermostable. L'affinité du biocatalyseur pour tous les alcools primaires à chaînes courtes s'est avérée relativement semblable avec une légère préférence pour le méthanol. Les conditions optimales ont été appliquées pour la synthèse de l'important arôme de banane, l'acétate d'isoamyle, dans un réacteur à lit fluidisé. Avec ce type de réacteur, le rendement de conversion de 50 mmoles de triacétine en acétate d'isoamyle a atteint près de 100% en 24h en employant 10% de biocatalyseur (p/p). De plus, le biocatalyseur a pu être réutilisé jusqu'à cinq reprises. L'utilisation de ce type de biocatalyseur pour la production industrielle d'esters d'acides carboxyliques à chaînes courtes semble prometteuse.

3.4 Article 2

Short-Chain Flavor Ester Synthesis in Organic Media by an *E. coli* Whole-Cell Biocatalyst Expressing a Newly Characterized Heterologous Lipase

Guillaume Brault¹, François Shareck¹, Yves Hurtubise², François Lépine¹, Nicolas Doucet^{1,3,4*}

¹INRS Institut Armand Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada, ²Innu Science Canada, Inc., Local 119, Trois Rivières, Québec, Canada, ³PROTEO, the Québec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, Québec, Canada, ⁴GRASP, Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines, Québec, Canada

Abstract

Short-chain aliphatic esters are small volatile molecules that produce fruity and pleasant aromas and flavors. Most of these esters are artificially produced or extracted from natural sources at high cost. It is, however, possible to 'naturally' produce these molecules using biocatalysts such as lipases and esterases. A gene coding for a newly uncovered lipase was isolated from a previous metagenomic study and cloned into *E. coli* BL21 (DE3) for overexpression using the pET16b plasmid. Using this recombinant strain as a whole-cell biocatalyst, short chain esters were efficiently synthesized by transesterification and esterification reactions in organic media. The recombinant lipase (Lip1AF5-2) showed good affinity toward glyceryl trioctanoate and the highest conversion yields were obtained for the transesterification of glyceryl triacetate with methanol. Using a simple cetyl-trimethylammonium bromide pretreatment increased the synthetic activity by a six-fold factor and the whole-cell biocatalyst showed the highest activity at 40 °C with a relatively high water content of 10% (w/w). The whole-cell biocatalyst showed excellent tolerance to alcohol and short-chain fatty acid denaturation. Substrate affinity was equally effective with all primary alcohols tested as acyl acceptors, with a slight preference for methanol. The best transesterification conversion of 50 mmol glyceryl triacetate into isoamyl acetate (banana fragrance) provided near 100% yield after 24 hours using 10% biocatalyst loading (w/w) in a fluidized bed reactor, allowing recycling of the biocatalyst up to five times. These results show promising potential for an industrial approach aimed at the biosynthesis of short-chain esters, namely for natural flavor and fragrance production in micro-aqueous media.

Citation: Brault G, Shareck F, Hurtubise Y, Lépine F, Doucet N (2014) Short-Chain Flavor Ester Synthesis in Organic Media by an *E. coli* Whole-Cell Biocatalyst Expressing a Newly Characterized Heterologous Lipase. PLoS ONE 9(3): e91872. doi:10.1371/journal.pone.0091872

Editor: Andrew C. Marr, Queen's University Belfast, United Kingdom

Received: October 15, 2013; **Accepted:** February 16, 2014; **Published:** March 26, 2014

Copyright: © 2014 Brault et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Collaborative Research and Development grant (awarded to FS) and NSERC Discovery grant RGPIN 402623-2011 (awarded to ND), as well as private funding from Innu-Science Canada. GB was the recipient of a BMP Innovation scholarship from NSERC and the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies. ND is also supported by a "Fonds de Recherche Québec - Santé" Research Scholar Junior 1 Career Award. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: YH was the research and development director of the commercial company Innu-Science Canada, Inc. GB's salary was provided by a grant from the Canadian and Québec Governments through the BMP Innovation scholarship program, aimed at fostering the development of university-industry partnerships. GB is a PhD student in FS's and ND's labs at INRS, and does not commercially benefit from the publication of this manuscript. As grant recipients from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada, FS and ND are two academic professors who were involved in collaborative research projects with YH's team at Innu-Science. FS and ND are not commercially involved with Innu-Science and neither owns stocks or shares in the company. YH and Innu-Science are fully committed to the full disclosure of all results and research materials resulting from the current research. All authors proclaim that this declaration of competing interests does not alter their adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: nicolas.doucet@iaf.inrs.ca

Introduction

Flavors and fragrances are broadly exploited molecules in the food, cosmetic, detergent, chemical and pharmaceutical industries, with an estimated global market exceeding \$US 22 billion per year [1]. Most flavors are either artificially produced using chemical synthesis or extracted from natural sources [2]. Chemical synthesis often relies on harsh procedures requiring toxic solvents and high-energy transformations, resulting in environmentally damaging processes with a very high carbon footprint. These approaches also suffer from the lack of substrate selectivity, creating racemic mixtures with undesired side products that reduce synthesis efficiency and increase production costs [3]. Extraction of flavors from natural raw materials is also challenging as the targeted molecules are often in very low concentration, thus drastically

increasing production costs. Nonetheless, there is a growing interest for the bio-production of these compounds from microorganisms, either using biosynthesis or bioconversion methods. The US and European regulations stipulate that flavors obtained from microbial or enzymatic processes can be considered as natural compounds as long as the initial raw material employed is from a natural source. The possibility of adding a "natural" label to a biotechnologically produced molecule is therefore very attractive, as there is a growing demand for greener products in the general public. The most cited example illustrating this fact is the 100-fold increase in gross retail price of naturally labeled vanillin relative to its synthetic, yet chemically identical counterpart [4–6].

Bio-production of flavors can be performed under mild conditions, leading to the synthesis of highly regio- and stereo-

specific, optically pure end-products [3]. The two main approaches for the bio-production of flavors are the *de novo* biosynthesis from live organisms and the bioconversion of precursors via enzymatic routes. Commercial successes using microorganisms have allowed the annual production of several tons of rare molecules, such as γ -decalactone, a powerful and tenacious peach-like aroma [4,6]. Using a recombinant auxotrophic *Yarrowia lipolytica* strain, ricinoleic acid could be efficiently converted to γ -decalactone with yields up to 9.5 g/L in 75 h [7]. However, performing bioconversion with live cells presents some limitations, such as slow growth and substrate/product toxicity. As a result, yields are often very low (rarely above 1 g/L), an issue that can only be circumvented via elaborate *in situ* extraction techniques such as gas stripping [3,8]. In some cases, however, *de novo* synthesis of relatively simple molecules is not a prerequisite, and taking advantage of pure or crude enzyme preparations to synthesize flavors can be much more efficient [9]. Enzymes are often more expensive than chemical catalysts, but techniques such as immobilization allow recycling of the biocatalyst and help reduce production costs [10]. More recently, up to 400 g/L of the fragrance compound 2(Z)-methyl-5-isopropyl-2,5-hexadienal (isovalal) were produced in only 2.5 h using permeated whole cells of *Pseudomonas rhodesia* CIP 107491 [11]. These results demonstrate that the use of whole-cell biocatalysts (WCB) is an industrially simple and cost-effective approach to enzyme immobilization [12,13].

Short- and medium-chain fatty acid esters are commonly used as important flavoring and fragrance molecules because of their typical fruity smell and high volatility [6,14]. Enzyme-catalyzed esterification is an effective alternative to the chemical synthesis of short-chain esters. Esterases and lipases (triacylglycerol hydrolases; EC 3.1.1.3) are important industrial enzymes with great potential for the production of flavors and fragrances [15,16]. These biocatalysts generally do not require cofactors and are stable in organic solvents, thus facilitating the synthesis of hydrophobic or water-labile compounds [17]. In non-aqueous conditions, lipases typically catalyze the esterification, interesterification, and transesterification of alcohols and fatty acids, the three main chemical reactions producing flavoring esters [16]. Lipases can also resolve racemic mixtures in a regio- and/or enantioselective fashion, such as the complete resolution of *D,L*-menthyl esters into pure *L*-menthyl [18].

Although lipolytic enzymes are found in all living organisms, most commercial enzymes originate from microbial sources [16,19]. As a result, bacterial genome mining of versatile microorganisms offers an attractive opportunity to uncover new lipolytic biocatalysts displaying interesting biochemical properties for industrial applications. To that end, one of the most powerful approaches relies on functional metagenomics of enriched biomass samples [20,21]. Several genes coding for genuine lipases have been successfully achieved using this approach [21–23]. Nevertheless, expression and production of promising biocatalysts is often poor and hazardous, yielding few industrial applications. As a result, several attempts have been made to improve the production of enzyme biocatalysts, including intracellular accumulation of lipases in the form of WCB [24,25]. Such production allows an enzyme to be used without complex procedures for isolation, purification, or immobilization, with the added benefit that whole cells act as a protective environment for biosynthesis [26]. Recently, Wei and collaborators successfully produced long-chain methyl esters using a heterologously expressed *Proteus* sp. lipase in permeated *E. coli* whole cells [27]. Such a simple yet effective WCB was also employed for the racemic resolution of *D,L*-menthyl esters with a *Bacillus subtilis* ECU0554 lipase,

demonstrating that the system can be applied to various lipolytic enzymes and bacterial systems [28].

We have recently reported the characterization of novel lipases from metagenomic studies [22,23]. One such lipase, LipIAF5-2, was heterologously expressed in the actinomycete *Streptomyces lividans* and showed promising short- and long-chain specificity while being solvent-tolerant and thermostable [22]. However, standard expression yields were too low to sustain any relevant industrial application. In the present work, we report the cloning and expression of this lipase as an *E. coli* whole-cell biocatalyst, showing that the resulting construct is a relevant WCB for the organic synthesis of important fatty acid esters in micro-aqueous media.

Materials and Methods

Materials, Bacterial Strains, and Plasmids

All triglyceride substrates were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON) using the highest purity available. Analytical standards for methyl acetate, isoamyl acetate, methyl butyrate, methyl hexanoate, methyl octanoate, ethyl butyrate, propyl butyrate, butyl butyrate and amyl butyrate were also purchased from Sigma-Aldrich. Analytical grade methyl nonanoate was purchased from Chromatographic Specialties (Brockville, ON). All other chemicals were obtained commercially and were of analytical grade.

The strain *Escherichia coli* DH11S was employed for all subcloning procedures. The strain *E. coli* BL21 (DE3) was employed for the heterologous expression of the lipase gene. Expression vector pET16b (EMD Millipore) was used for the production of the N-terminal histidine-tagged recombinant protein. Plasmid pAFD95A was used as template for the amplification of the *lipIAF5-2* gene (Genbank EU660533) [22].

DNA Manipulations

The recombinant gene coding for lipase LipIAF5-2 was amplified without signal peptide (from Ala²⁰ [22]) using primers F5_2_NdeI 5'-AAACATATGGCCACCCGCCGGGGGGC-GATCC-3' and F5_2_XhoI 5'-TTTCTCCAGTCAG-

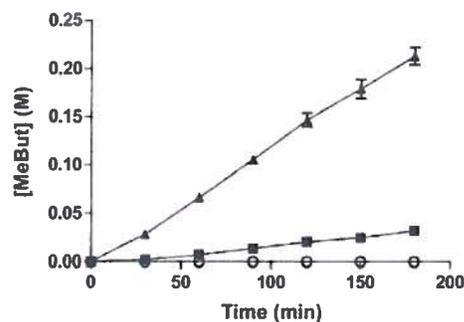


Figure 1. Effect of whole-cell biocatalyst (WCB) pretreatment on ester synthesis activity. Ten milligrams of each biocatalyst was used to convert 1 mmol of glyceryl tributyrate to methyl butyrate using 4 molar equivalents of methanol and 5% (w/w) water in *tert*-butanol over a period of 3 hours at 40 °C. The control strain expressing the empty pET16b vector (open circles), the LipIAF5-2 strain without CTAB pretreatment (closed squares) and the strain with CTAB permeation (closed triangles) were employed. Results are averaged over three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0091872.g001

Table 1. Kinetic parameters of recombinant LipAF5-2 toward short chain triglycerides.

Substrate	$K_m \pm SD^a$ (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Glyceryl tributyrin (C4:0)	5.46 ± 0.47	2.9 × 10 ⁴	5.3 × 10 ³
Glyceryl trioctanoate (C8:0)	0.63 ± 0.01	2.3 × 10 ⁶	3.7 × 10 ⁶
Glyceryl trioleate (C18:1)	2.47 ± 1.0	1.1 × 10 ⁶	4.5 × 10 ⁵

^aStandard deviation was derived from two different experiments, each performed in triplicate.
doi:10.1371/journal.pone.0091872.t001

TACGGGGCAGTTACGCTCGGCTATTGGGAG-3'. Restriction sites were added to both ends (5'-*Nde*I and 3'-*Xho*I, both underlined) to allow subcloning in expression vector pET16b. PCR-amplified fragments were cleaned using the Qiagen PCR cleaning kit, cloned into the *Nde*I/*Xho*I-digested pET16b, and transformed into *E. coli* DH11B, yielding the pET16b-F52 construct used for protein expression. The integrity of both plasmid strands was confirmed by DNA sequencing using forward and reverse T7 universal primers (Génome Québec).

Heterologous Expression and Purification of LipAF5-2

The heterologous expression and purification of LipAF5-2 from *E. coli* BL21 (DE3) was performed as recently described using a Ni-NTA (Qiagen) affinity column [29]. All cultures were inoculated from fresh Petri cultures following bacterial transformation with the sequenced constructs. Analysis of the purified proteins was performed by standard SDS-PAGE procedures. Western Blot and Zymogram analyses were employed to confirm the activity of the recombinant LipAF5-2 at each purification step. The presence of the recombinant protein was revealed using JemtoCHROMO-HRP (G-Biosciences) following the manufacturer's instructions. The identity of the protein was confirmed by mass spectrometry, as previously described [29,30].

Preparation of the *E. coli* Whole-cell Biocatalyst

E. coli BL21 (DE3) harboring construct pET16b-F52 was grown in Erlenmeyer flasks as previously described and cells were treated as published, with minor variations [27]. Cell pellets were washed twice with cold physiological saline buffer (PBS, pH 7.0) prior to suspension in PBS supplemented with 0.3% cetyl-trimethylammoniumbromide (CTAB) for 60 min at room temperature with gentle agitation. Treated cells were centrifuged and washed once with PBS prior to lyophilization. Cells were then used as a dry powder biocatalyst.

Enzyme Assays

Standard hydrolysis assays and enzyme kinetics. Standard assays were performed by measuring the rate of triglyceride hydrolysis using a previously described pH-stat method [29]. The fatty acids released from emulsions of the triacylglycerides (TAG) glyceryl triacetin (C2:0), glyceryl tributyrin (C4:0), glyceryl trioctanoate (C8:0), and glyceryl triolein (C18:1) were automatically titrated using a 0.05 M NaOH solution to maintain a constant pH of 9.0 at 40  C in a Metrohm 800 Dosino apparatus (Mississauga, ON). One unit (U) was defined as the amount of enzyme releasing 1  mol of fatty acid per minute in the conditions described. The effect of temperature on enzyme activity was determined by assaying the hydrolytic activity towards glyceryl trioctanoate using the same procedure. Enzyme kinetics were performed with dilutions of the purified lipase and various

triglyceride substrates at concentrations varying from 0.1 to 100  M at the optimal temperature of 40  C. The catalytic rate constant k_{cat} (s⁻¹) was calculated from the initial steady-state velocity according to the equation $k_{cat} = V_{max}/[E]$.

Esterification and transesterification assays. Standard transesterification assays were conducted using 1 mmol of the glyceryl tributyrate substrate, 4 mmol methanol and 5% water (w/w) in a final volume of 1 mL, completed with *tert*-butanol. The mixture was preheated and added to preheated conical-bottom screw-cap microvials (1.5 mL) containing 10 mg of the dry whole-cell biocatalyst to start the reaction. The reaction was carried out at the optimal temperature of 40  C and 1400 rpm using a thermomixer. At each predetermined time interval, a 25  L aliquot was withdrawn with a Hamilton gastight syringe and diluted 1:20 in 2-propanol to quench the reaction. Methyl nonanoate was added as an internal standard and the samples were centrifuged at 15,000 g for 5 min prior to transfer into microvials for HPLC analysis. To evaluate the effect of water on ester production, 1 mmol of glyceryl tributyrate was dissolved as previously mentioned and the water content was adjusted from 0% to 75% (w/w). The reaction was carried out at the optimal temperature of 40  C. Comparison between esterification and transesterification reactions was performed with 1 mmol of butyric acid or glyceryl tributyrate under the conditions described above, adding 100 mg of a 3-  molecular sieve to withdraw water produced during the esterification reaction. The effect of acyl chain length on esterification was tested using 4 mmol of methanol with 1 mmol of acetic, butyric, hexanoic, or octanoic acid in the standard assay conditions. The effect of alcohol as acyl acceptor for transesterification was tested using 1 mmol of glyceryl tributyrate and 4 mmol of either methanol, ethanol, 1-propanol, 1-butanol, or pentyl alcohol. The effect of co-solvent on synthetic activity was carried out using the same standard assay using either acetonitrile or *tert*-butanol as water-soluble polar solvents, ethyl acetate or 2-octanol as hydrophobic polar solvents, and *n*-hexane or *n*-heptane as hydrophobic non-polar solvents.

HPLC Analysis

Samples (10  L) were loaded onto a Phenomenex Synergi Hydro-RP C-18 silica-based column (150   4 mm) (Torrance, CA) using an isocratic mobile phase of 70% acetonitrile, 5% methanol, 25% water, and 0.2% formic acid (v/v) at a flow rate of 1 mL/min and 40  C. Esters produced were detected at 210 nm and identified by comparing retention times of pure analytical standards. Quantification was performed by dividing the slope of standard curves by the measured area under the curve for each identified compound.

Fluidized Bed Reactor for Flavor Ester Production

A fluidized bed reactor (FBR) was built using an empty HPLC preparative column (10 cm³ volume, 21.5 mm diameter). A 0.22-

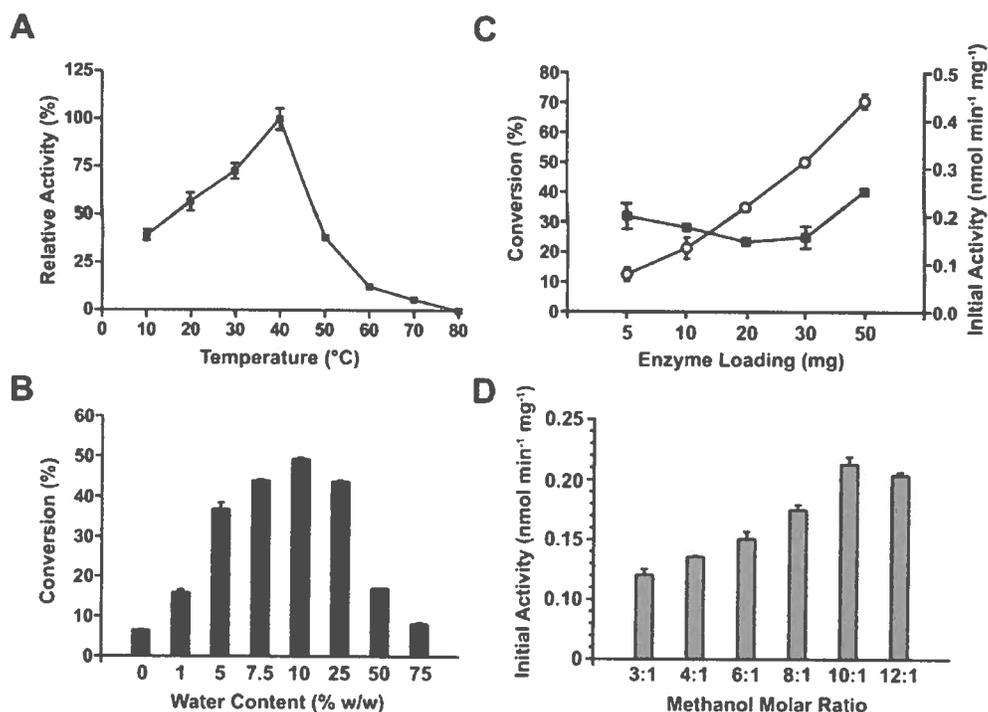


Figure 2. Effect of temperature (A), water content (B), enzyme loading (C), and methanol molar ratio (D) on the LipIAF5-2 WCB activity. A) Effect of temperature on the hydrolytic activity of the LipIAF5-2 WCB. Enzyme activities are expressed relative to maximal activity observed at 40 °C (full squares). B) Effect of water content by percentage of substrate weight. Enzyme activities are expressed as final conversion of 1 mmol of glyceryl tributryrate and 4 mmol of methanol after 6 hours of incubation at 40 °C. C) Effect of enzyme loading on the conversion of 1 mmol of glyceryl tributryrate using 4 molar equivalents of methanol as acyl acceptor in the aforementioned conditions. Conversion of glyceryl tributryrate (open circles) is expressed as final percentage of theoretical maximal yield (3 mmoles of product) after 3 hours of reaction. Initial specific activity (full squares) is expressed as the slope of liberated product determined under linear conditions over a period of at least 30 minutes. Biocatalyst amounts correspond to 1.65, 3.30, 6.61, 9.92 and 16.53% of substrate weight, respectively. D) Effect of alcohol molar ratios on the LipIAF5-2 WCB initial activity. Initial activity was determined in linear conditions over a 3-hour period using 10 mg of WCB, 5% water (w/w), 1 mmol of glyceryl tributryrate and various molar ratios (alcohol/substrate) of methanol in a final volume of 1.5 mL. doi:10.1371/journal.pone.0091872.g002

μm Anodisc 25 Whatman filter was placed over both frits to avoid cell leaching and filters were covered with a 25-mm rubber O-ring to ensure a leak-proof assembly. One gram of lyophilized WCB (approximately $7 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) was loaded on the column and cells

were settled by pumping through warm *tert*-butanol. The flow was directed to keep cells in suspension and to avoid any build-up at the filters, thus creating a FBR. The apparatus was placed into a heated chamber at 35 °C and the reactions were started by

Table 2. Impact of co-solvents on the initial activity of the LipIAF5-2 WCB.

Solvent	Partition Coefficient ($\log P^a$)	Dielectric Constant (ϵ^b)	Initial activity ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Conversion ^c (%)
Acetonitrile	-0.34	37.5	0.030	12.8±1.7
Ethyl acetate	0.73	6.0	0.050	16.9±1.9
<i>tert</i> -butanol	0.35	10.9	0.090	31.8±2.7
2-octanol	2.9	10.3	0.170	67.9±0.5
<i>n</i> -hexane	4.0	1.9	0.050	21.8±2.7
<i>n</i> -heptane	4.5	1.9	0.060	24.9±1.2

^aTaken from [35].

^bTaken from [30].

^cConversion is expressed as a percentage of maximal theoretical yield after 60 minutes of reaction under standard assay conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0091872.t002

pumping a pre-warmed mixture of 50 μ moles of glyceryl tributyrate, 250 μ moles of isoamyl alcohol, 10% water (w/w) and *tert*-butanol to a final volume of 50 mL (1 mL/min flow rate). 50- μ L aliquots were taken at different time intervals over a period of 24 hours and analyzed by HPLC for ester content. Between each synthesis cycle, the FBR column was washed with 300 mL of warm *tert*-butanol at 1 mL/min.

Results and Discussion

Recombinant Expression and Purification of LipAF5-2

Short chain esters are pleasant smelling molecules usually produced using harsh chemical routes and/or laborious extraction steps from natural feedstock. Using biocatalysts such as lipases for their chemical synthesis could help overcome these issues, in addition to providing the commercialized products with the highly sought 'natural' label [31,32]. The need for novel enzymes such as lipases and esterases with interesting biochemical properties is in high demand and metagenomic studies have recently proven resourceful for their discovery [20,33]. We previously expressed the recombinant LipAF5-2 isolated from a metagenomic study in the versatile Gram-positive *Streptomyces lividans* [22,23]. While the protein was produced as an active extracellular form in this organism, expression yields were too low for industrial applications. Herein, we focus on an intracellular expression model of the LipAF5-2 lipase using an *E. coli* whole-cell biocatalyst (WCB). The industrial use of esterases and lipases requires an easy overexpression system that can produce very high yields of active enzyme in a short amount of time. Furthermore, the industrial use of biocatalysts often requires enzyme immobilization to facilitate large-scale production and to reduce costs. Still, the price of immobilized biocatalysts remains a bottleneck for these biocatalysts to be considered a profitable alternative to chemical synthesis [10]. Using whole-cell biocatalysts offers numerous advantages over free enzymes and represents a cost-effective alternative for a number of industrial applications [13]. To attain this goal, we developed an *E. coli* recombinant system that can achieve high yields of LipAF5-2 from simple LB medium growth at 16°C in only 24 hours. Under these conditions, the enzyme was overproduced as a cytoplasmic, soluble biocatalyst with yields exceeding 350 mg/L. High yields of intracellular LipAF5-2 expression provide a strong basis for the development of an industrial WCB, potentially eliminating the need for cell lysis and protein purification steps altogether. Nevertheless, LipAF5-2 was also purified to near homogeneity from a fast, single-step immobilized metal affinity chromatography (IMAC) with an average yield of 50 \pm 2 mg (average of three independent lots), confirming that the enzyme is an attractive candidate for large-scale production (Fig. S1A). Two endogenous lipolytic enzymes were present in the *E. coli* strain with control plasmid, both of which were further efficiently discarded by chromatography (Fig. S1B). The recombinant LipAF5-2 protein showed an apparent molecular weight of 32 kDa, consistent with the expected theoretical weight of 32.6 kDa (including the His-tag). SDS-PAGE showed no protein contaminant and the identity of the protein was confirmed with anti-His-tag Western Blot analysis. The identified protein was further digested with trypsin for peptide sequencing using mass spectrometry with Mascot analysis. Our results confirmed that only the GenBank entry ACC95208.1 was obtained, with 62% sequence coverage and an MOWSE score of 785, providing convincing evidence of the purified protein identity. Mass spectrometry analysis of the purified protein confirmed a total protein mass of 32,564 Da, corresponding to the theoretical mass of the mature His-tagged protein (starting

from Ala²⁰) plus 11 Da, which may result from a post-translational arginine or lysine mono-methylation.

Kinetics of LipAF5-2 toward triglycerides. To evaluate the potential of LipAF5-2 for short chain ester synthesis, the kinetic parameters of the purified enzyme were assessed for hydrolysis of various short chain TAGs (C2:0, C4:0, C6:0) and one long chain TAG (C18:1). Kinetic parameters for LipAF5-2 are reported for substrate concentrations where the enzyme displays Henri-Michaelis-Menten behavior (Table 1). Results for glyceryl triacetate are not listed, as the apparent kinetics of the enzyme could not reach a saturation point in the range of substrate concentrations tested. Higher substrate concentrations could not be achieved without impairing other parameters and were therefore discarded. The calculated k_{cat} values decrease as the acyl chain length increases for substrates C4:0 to C18:1, but the highest catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) was obtained for glyceryl triacetate, a mid-chain long substrate. This result is primarily caused by an 8.6-fold and 2.1-fold greater affinity (K_m) of LipAF5-2 for C3:0 relative to C4:0 and C6:1 substrates, respectively. These results are similar to the hydrolysis profile of the previously described enzyme characterization with *p*-nitrophenyl esters [22]. Still, the enzyme showed good catalytic efficiency toward the glyceryl trioleate substrate (C18:1), thus confirming its true lipase nature [19]. The free and purified recombinant enzyme expressed from *E. coli* had a strong tendency to precipitate after purification, probably due to the very high expression yields obtained with this bacterial system. The natural tendency of lipases for self-aggregation due to their surface hydrophobicity could also explain such behavior [34]. Complementation with various additives such as detergents proved unsuccessful at minimizing LipAF5-2 denaturation. Therefore, we decided to use the recombinant cell as a carrier to circumvent this problem, allowing enzyme activity, stability and immobilization at once. Preliminary tests of the WCB showed that a control strain expressing the empty vector had no synthetic activity, while the recombinant LipAF5-2 strain was efficient for methyl butyrate (MeBut) synthesis (Fig. 1). It is known that the outer membrane of Gram negative bacteria is very selective toward most hydrophobic molecules [35]. Therefore, we decided to circumvent this limitation using a simple permeabilization step with the cationic surfactant CTAB prior to lyophilisation of the WCB [27]. This simple pre-treatment increased the synthesis activity by a six-fold factor (Fig. 1). Previous WCB reports highlighted similar observations and recommended cell permeation to cope with mass transfer issues across cell membranes [6,11,24,27,36].

Effect of Temperature on WCB

The effect of temperature on LipAF5-2 WCB was determined by monitoring the hydrolytic activity toward glyceryl triacetate at various temperatures from 10 to 40°C (Fig. 2A). Maximum activity was observed at 40°C, with a drastic decrease observed above this temperature. This optimal temperature is different from the 60°C optimal temperature previously reported with the free wild-type enzyme [22]. This discrepancy could be explained by the fact that we are using the truncated and tagged form of LipAF5-2 (mature enzyme without signal peptide), and by the different substrates tested in both reports (triglyceride vs. *p*-nitrophenyl esters). Indeed, it is documented that various substrates can shift the observed optimal temperature of enzymes by creating protective effects on their thermal denaturation [37]. These results nevertheless suggest that the LipAF5-2 WCB could be useful for ester synthesis at low- to mid-range temperatures.

Immobilized lipases generally show similar or higher optimal temperatures relative to their free counterparts [38]. As a result,

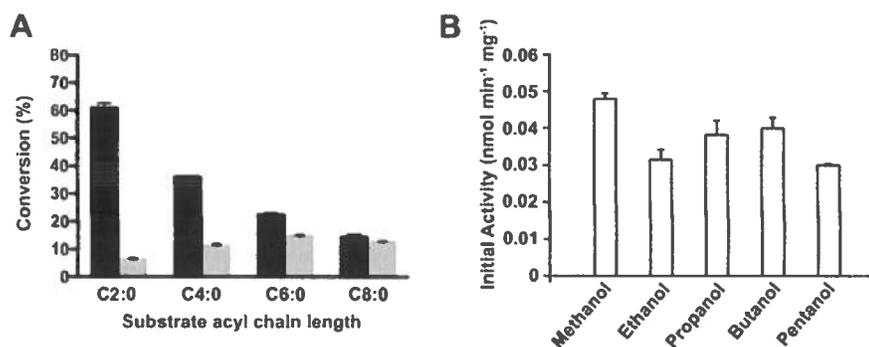


Figure 3. Conversion rates of LipIAF5-2 WCB transesterification and esterification toward acyl donors and acceptors. A) The full bars represent the conversion of triglyceride substrates and the shaded gray bars the conversion of equivalent free fatty acids (FFA). The substrates employed are glyceryl triacetate and acetic acid (C2:0), glyceryl tributyrinate and tributyrinic acid (C4:0), glyceryl trihexanoate and hexanoic acid (C6:0) and glyceryl trioctanoate and octanoic acid (C8:0). The results are expressed as the molar conversion of 1 mmol of each substrate after 6 hours of incubation at 40 °C with 4 molar equivalents of methanol and 10 mg of LipIAF5-2 WCB. B) Impact of acyl acceptors on transesterification by LipIAF5-2 WCB. Transesterification of 1 mmol of glyceryl tributyrinate was done using 4 molar equivalents of each primary alcohols for 3 hours at 40 °C using 10 mg of LipIAF5-2 WCB and 10% (w/w) water. Results are averaged over two independent experiments performed in triplicate. doi:10.1371/journal.pone.0091872.g003

the thermal stability of LipIAF5-2 was also assayed with a pre-incubation time of 3 hours at various temperatures in an aqueous buffer. Measurement of residual hydrolysis toward glyceryl triacetate showed a WCB thermal denaturation profile identical

to that of the free enzyme (data not shown). While we did observe that cell immobilization considerably increased the thermostability of LipIAF5-2 in organic media (not shown), these results show that cell permeation does not provide significant thermal stability in

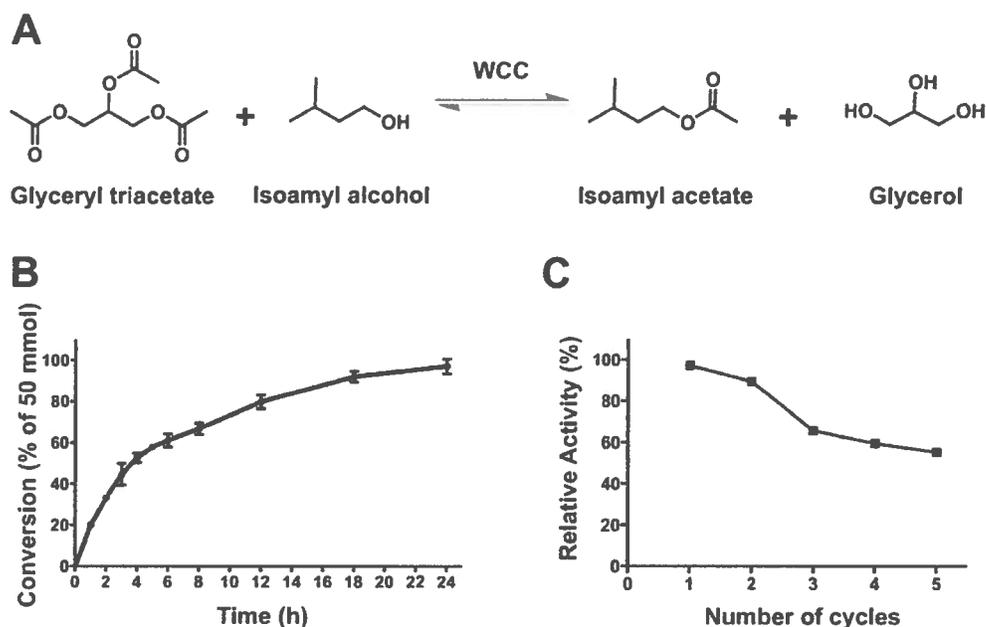


Figure 4. Time-course conversion of glyceryl triacetate into isoamyl acetate using the LipIAF5-2 WCB. A) Reaction scheme for the transesterification of glyceryl triacetate into isoamyl acetate in presence of isoamyl alcohol. B) Time-course production of isoamyl acetate by LipIAF5-2 WCB immobilized in a fluidized bed reactor. C) Effect of LipIAF5-2 WCB recycling on the conversion yield of isoamyl acetate production. One gram of LipIAF5-2 WCB was loaded in an empty HPLC preparative column with a dead volume of 10 cm³ and placed in a heated chamber. The reaction mixture contained 50 mmoles of glyceryl triacetate as acyl donor and isoamyl alcohol at a molar ratio of 5:1 with 5% water (w/w). The mixture was pumped in recirculating mode through the column at a flow rate of 1 mL/min for 24 h for each cycle. Cells were washed in open mode with 350 mL of *tert*-butanol between each cycle. All experiments were performed in triplicate. doi:10.1371/journal.pone.0091872.g004

aqueous media relative to the free LipIAF5-2 enzyme [13]. This result contrasts with other reports, where immobilized esterases in an *E. coli* WCB have been shown to display 11-fold increases in enzyme half-life relative to crude extracts of the free enzyme form [23].

Effect of Water Content and Organic Solvents on the Activity of the LipIAF5-2 WCB

Water content in any organic bio-synthesis is essential for enzyme flexibility and for optimal catalytic activity [17]. The effect of water content on WCB initial activity was examined using water concentrations ranging from 0% to 75% (w/w) in *tert*-butanol. While maximum initial activity was observed at 25% water (not shown), maximum molar conversion was obtained with 10% water content (Fig. 2B). As expected, this observation suggests that hydrolysis competes with organic synthesis at higher water concentrations. Although synthetic activity of most lipases is optimal at relatively low water content in organic systems (typically below 1% (w/w)), previous studies with *E. coli* WCB showed optimal synthesis activity at water contents up to 70% (w/w) [27]. Our results differ from those obtained by Wei and co-workers, owing to the fact that LipIAF5-2 WCB probably needs lower water content to sustain proper conformational flexibility than other intracellular WCB. Similar results were obtained with fungal WCB, albeit for the transesterification of long-chain TAGs [24,39,10]. The lower reaction rates observed at higher water contents such as 50 and 75% is probably due to the formation of a bi-phasic system, as the triglycerides are highly insoluble in the excess water phase. Lower water contents also allow for a decrease in the competing hydrolysis reaction. Nevertheless, the fact that the LipIAF5-2 biocatalyst is optimal at a relatively high water content compared to most free and immobilized enzyme systems is interesting, as it would allow the esterification of free fatty acids without the need for *in situ* removal of the water produced during the reaction. Direct esterification of free fatty acids (FFA) in organic media is an important industrial reaction for flavor synthesis. As a result, elaborate strategies must be applied to avoid progressive decreases in rates caused by the production of water, such as water adsorbing materials, pervaporation, gas stripping and continuous distillation [2]. The use of a simple, cheap and water-tolerant WCB for esterification reactions could circumvent the need to implement such cumbersome and expensive methods for the industrial production of flavors.

Synthetic reactions in microaqueous organic media are also influenced by hydrophobicity and polarity of the medium. It is generally accepted that the most suitable co-solvents are the ones with a log *P* (where *P* is the partitioning coefficient of solvent between 1-octanol and water) higher than 2, ideally above 4 [41]. Solvents below these values are known to have a deleterious impact on dehydrated enzymes by stripping the tightly bound water layer from the biocatalyst, resulting in enzyme structure perturbation [17]. Depending on water activity and hydrophobicity of the substrates and products, different organic solvents could even modulate the specificity of the enzyme [17]. To test this, the activity of the WCB was assessed toward transesterification of glyceryl tributyrates with methanol in various water-soluble polar solvents (acetonitrile and *tert*-butanol), hydrophobic polar (ethyl acetate and 2-octanol) and non-polar solvents (*n*-hexane and *n*-heptane). The results are summarized in Table 2. As shown, the presence of polar groups combined to a hydrophobic core seems beneficial to enzyme activity, with the highest activities observed for 2-octanol and *tert*-butanol. While water-soluble co-solvents are generally known to be deleterious, the fact that *tert*-butanol is a good medium is interesting and suggests that alcohols employed as

substrates could even be suitable solvents for the synthetic reactions. Reports showed that substrate and product hydrophobicity is also very important for the type of solvent suitable to the enzyme [41]. Since *tert*-butanol is miscible with water and all substrates tested, in addition to the fact that it has a lower boiling point thus easier to strip from the synthesized esters, it was chosen as the optimal solvent for all further chemical reactions.

Impact of LipIAF5-2 WCB Loading on Ester Synthesis

The influence of biocatalyst loading on the production of methyl butyrate was also examined. As show in Figure 2C, a direct correlation between molar conversion of glyceryl tributyrates and increased WCB concentration was observed. The conversion of 1 mmol of glyceryl tributyrates after a 3-hour incubation increased from 12.5% to 70.6% when the amount of biocatalyst increased from 5 mg to 50 mg. Further increasing cell loading in a fixed-volume vessel was not possible without impairing sampling, since the reaction mixture volume occupied by the biocatalyst was greater than the total volume available. Increasing the total reaction volume to a bigger vessel did, however, reduce WCB synthesis rates, probably due to dilution of the reactants with additional co-solvent. Nevertheless, our maximal ester synthesis yield was observed at only 6% WCB loading (w/w). This is much lower than the previous 30% (w/w) ratio reported for optimal transesterification of olive oil [27], yet very similar to the optimal 1% (w/w) ratio observed in a recent study on grease transesterification [42]. A solution to the issue of the volume occupied by the WCB would be to use a fluidized bed reactor (FBR), where cells act as a matrix trapped inside a column and the reaction mixture is pumped through the cells (*vide infra*). This type of bioreactor minimizes the clogging and backpressure issues often observed with packed bed reactors, in addition to easing the recycling of the catalyst as compared with most batch reactors [43,44].

Effect of Alcohol Concentration on LipIAF5-2 WCB

Biosynthesis of alcohol esters is often limited by substrate concentrations, where high amounts of water-soluble alcohols denature the biocatalyst by interfering with the enzyme-bound water layer [45]. For the transesterification of TAGs, it is often necessary to add the alcohol in a stepwise manner to keep the actual concentration below the stoichiometric ratio of 3:1 (alcohol:substrate) [16]. The protective environment produced by the cell could therefore protect the lipase from this stripping effect. Contrary to most lipases, LipIAF5-2 showed increased activity with increasing molar ratios of acyl acceptor, with a maximal velocity observed at a molar ratio of 10:1 (methanol:glyceryl tributyrates) (Fig. 2D). This represents a concentration of 27% (v/v) methanol in the reaction vessel, illustrating that the LipIAF5-2 WCB has a very good resistance to alcohol inhibition. Wei and co-workers did report the highest WCB activity at ratios of 5:1, but only with water content between 50 and 100% (w/w) [27]. To the best of our knowledge, this is the first report of such high methanol tolerance for a lipase biocatalyst, a property that could prove very useful to avoid stepwise addition of methanol during biosynthesis of various methyl esters.

Impact of Acyl Donor on Ester Synthesis

The specificity of the WCB toward various TAGs and equivalent FFA as acyl donors was assessed for the transesterification and esterification reactions, respectively (Fig. 3A). Results showed a remarkable difference between the specificity of the enzyme for the transesterification and esterification reactions. While transesterification is favored by short acyl donor chains, esterification is compromised by acetic acid (C2:0). Numerous

studies reported potent enzyme inhibition by very short FFA acyl donors [11,17,18]. One explanation is the possible dead-end inhibition conferred by the carboxylic acid reacting with the active site serine residue of the hydrolase [18]. Furthermore, esterification is much slower than transesterification in the conditions tested, suggesting that LipIAF5-2 has higher affinity for glycerol esters. Esterification with 0.5 M FFA instead of 1 M produced the same conversion yields (data not shown). However, this shows that the LipIAF5-2 WCB is tolerant to high concentrations of FFA relative to other immobilized lipases under similar conditions [32,49]. To assess the impact of the acyl acceptor, the synthetic activity of the WCB was performed using various primary alcohols (Fig. 3B). Results show that methanol is the best acyl acceptor for LipIAF5-2 WCB. Nevertheless, the enzyme could efficiently substitute methanol for ethanol, propanol, butanol or pentanol, demonstrating the high potential of the LipIAF5-2 WCB for the synthesis of most short-chain flavor esters.

Repeated-batch Transesterification by LipIAF5-2 WCB

To demonstrate the feasibility of flavor ester production using the optimized synthetic conditions, a FBR was built using an empty preparative HPLC column filled with the LipIAF5-2 WCB (Fig. S2). The model reaction selected was the transesterification of glyceryl triacetate into the important banana fragrance and pear-drop ingredient isoamyl acetate (Fig. 1A). Using 1 g of WCB for 50 μ moles of substrate (biocatalyst loading ratio of 9.2% w/w), time-course reactions showed a maximal conversion yield of $97.2 \pm 3.3\%$ after 24 hours of incubation in recirculating mode (Fig. 1B). Using the adequate continuous flow in an open circuit (*i.e.* non-recirculating), one could expect to target the saturation point of the biocatalyst, where a production of 3.9 g of isoamyl acetate per hour was achieved with 1 gram of WCB. This demonstrates a very interesting production rate, as the synthesized flavor can easily be purified using simple distillation procedures. Furthermore, immobilization of the WCB on a HPLC column allowed recycling of the biocatalyst after an easy washing step with *tert*-butanol. Using these conditions, the LipIAF5-2 WCB could be efficiently recycled up to 5 times without any cells loss, albeit with a significant decrease in production yields ($55.3 \pm 0.3\%$ after 5 cycles at 35°C) (Fig. 4C). This efficiency drop could either be caused by enzyme denaturation after prolonged exposure at 35°C and/or a direct consequence of enzyme leaching from the cells. Previous reports on WCB did highlight this phenomenon in

similar *tert*-butanol organic systems [50]. Among the suggested improvements to help minimize enzyme leaking, covalent binding of the enzyme within the cell using glutaraldehyde was suggested [51]. Alternatively, enzyme immobilization at the cell surface using natural membrane anchors could represent a powerful alternative, thus avoiding the permeation step required to reach significant synthesis rates [32,52,53]. Such immobilization is currently under investigation to improve the industrial potential of the LipIAF5-2 WCB.

Conclusions

In the present work, we have shown that an *E. coli* recombinant system expressing the novel lipase LipIAF5-2 extracted from a metagenomic study could easily be used as an efficient whole-cell biocatalyst for the synthesis of short-chain flavor esters. Following a simple permeation step, the WCB showed high conversion yields and good recycling properties in micro-aqueous media. Furthermore, the biocatalyst displayed high versatility toward short-chain precursors typical of flavor esters, combined to remarkable resistance to fatty acid and alcohol denaturation. These results demonstrate a promising potential for the industrial biosynthesis of relevant short-chain flavor esters under mild conditions.

Supporting Information

Figure S1 SDS-PAGE (A) and zymogram (B) of purified recombinant LipIAF5-2. Lane 1: Precision Plus All Blue molecular weight standard (Bio-Rad). Lane 2: Soluble fraction of control strain harboring vector pET116b. Lanes 3: soluble fraction of *E. coli* strain harboring pET116b-F52. Lane 4: Purified LipIAF5-2 after IMAC chromatography. The equivalent of 5 μ g of purified enzymes were loaded in lane 4.

(TIF)

Figure S2 Fluidized bed reactor scheme. See Materials and Methods for details.

(TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GB FS YH FL ND. Performed the experiments: GB FL. Analyzed the data: GB ND. Contributed reagents/materials/analysis tools: FS YH FL ND. Wrote the paper: GB ND.

References

1. Leffingwell & Associates website. Available: http://www.leffingwell.com/top_10.htm. Accessed 2013 September 1.
2. Lango MA, Saurman MA (2006) Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol Biotechnol* 44: 335–353.
3. Vandamme EJ, Soetaert W (2002) Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J Chem Technol Biotechnol* 77: 1323–1332.
4. Serra S, Fuganti C, Brenna E (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol* 23: 193–198.
5. Krings U, Berger RG (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 1–8.
6. Schrader J, Eschmann MM, Sell D, Hiltner JM, Rabenhorst J (2004) Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds: current industrial processes and future prospects. *Biotechnol Lett* 26: 163–172.
7. Pagot Y, Endrizzi A, Nicoud JM, Belin JM (1997) Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Sarcoma lipolytica* to improve gamma-decalactone production yields. *Let Appl Microbiol* 25: 113–116.
8. Krings U, Berger RG (2000) In situ recovery of the aroma compound perillene from stirred-tank cultured *Utricularia vesicaria* using gas stripping and adsorption on polystyrene. *Biotechnol Lett* 30: 1347–1351.
9. Berger RG (2009) Biotechnology of flavours: the next generation. *Biotechnol Lett* 31: 1651–1659.
10. Hill G (2003) Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur J Lipid Sci Technol* 105: 601–607.
11. Fontanille P, Larroche G (2003) Optimization of isononanal production from alpha-pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas chloritica* CIP 107491. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 534–540.
12. Fukuda H, Hama S, Tamalampudi S, Noda H (2008) Whole-cell biocatalysis for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol* 26: 668–673.
13. Ishige T, Honda K, Shimizu S (2005) Whole organism biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 9: 174–180.
14. Mahapatra P, Kumari A, Garlapati VK, Banerjee R, Nag A (2009) Enzymatic synthesis of fruit flavors esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *J Mol Catal B: Enz* 60: 57–63.
15. Sharma D, Sharma B, Shukla AK (2011) Biotechnological approach to microbial lipase: a review. *Biotechnology* 10: 23–40.
16. Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 39: 235–251.
17. Klibanov AM (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409: 241–246.
18. Schreier P (1997) Enzymes and flavour biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 55: 51–72.
19. Jaeger KE, Reetz MT (1990) Microbial lipase forms versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16: 396–403.
20. Kennedy J, O'Leary ND, Kiran GS, Morrissey JP, O'Gara F, et al. (2011) Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J Appl Microbiol* 111: 707–799.

3.5 Supplemental data

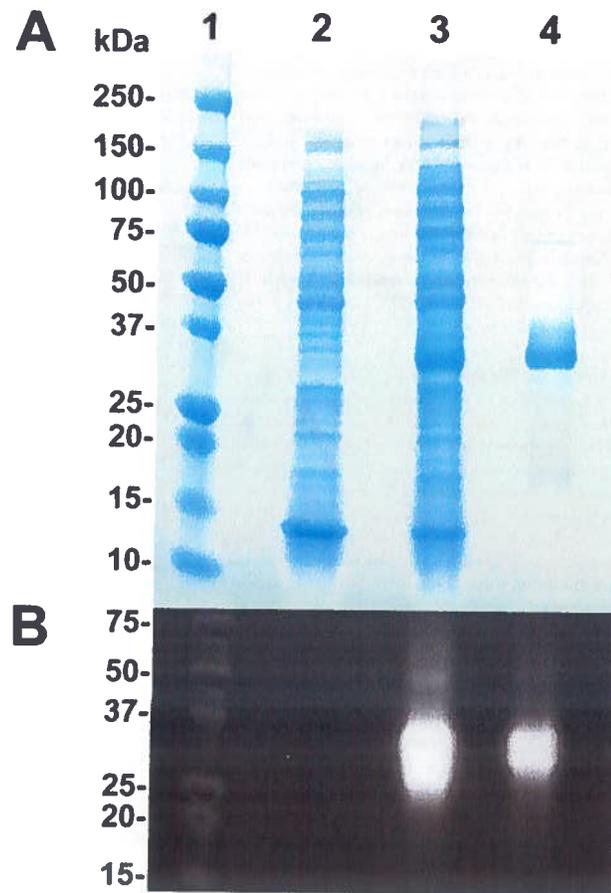


Figure S1. SDS-PAGE (A) and zymogram (B) of purified recombinant LipIAF5-2. Lane 1: Precision Plus All Blue molecular weight standard (Bio-Rad). Lane 2: Soluble fraction of control strain harboring vector pET16b. Lanes 3: soluble fraction of *E. coli* strain harboring pET-IAF52. Lane 4: Purified LipIAF5-2 after IMAC chromatography. The equivalent of 5 μ g of purified enzyme were loaded in lane 4. (doi:10.1371/journal.pone.0091872.s001)

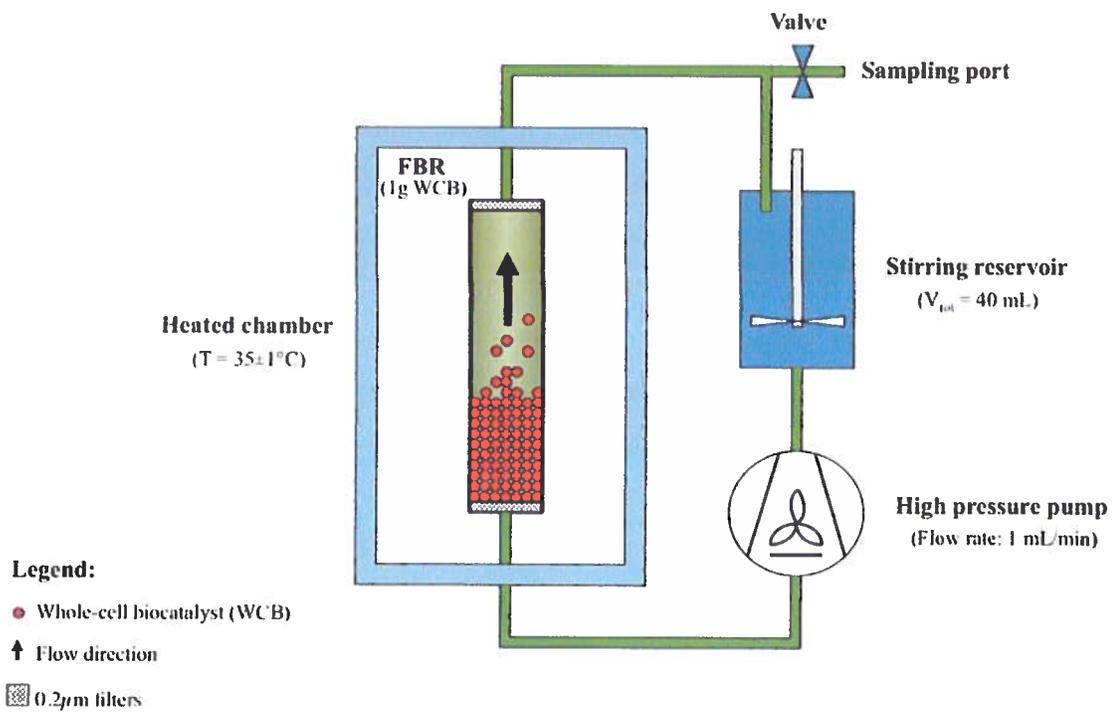


Figure S2. Fluidized bed reactor scheme. See Materials and Methods for details.
(doi:10.1371/journal.pone.0091872.s002)

3.6 Discussion

L'expression intracellulaire de la lipase LipIAF5-2 chez *E. coli* a permis d'obtenir des concentrations de protéines environ 35 fois supérieures à ce qui a été obtenu précédemment et ce, sans optimisation de biais d'usage de codons [160, 221]. De plus, l'enzyme est présente en majorité sous forme soluble (voir Figure A4, Annexe V). Une estimation par densitométrie a permis d'évaluer que la forme soluble correspond à environ $49.4 \pm 0.4\%$ des protéines cytoplasmique solubles. Néanmoins, même si la fraction insoluble correspondant aux corps d'inclusion demeure non-négligeable, son activité biologique (visible sur zymogramme SDS-PAGE, voir Figure A4, Annexe V) semble indiquer que l'expression intracellulaire de cette lipase est un bon moyen de produire un biocatalyseur en cellules entières. Plusieurs études mentionnent l'activité biologique d'agrégats cytoplasmique formés d'enzymes recombinantes variées [212]. Cependant, selon nos connaissances, ceci constitue le premier rapport d'activité biologique de corps d'inclusion d'une lipase bactérienne recombinante.

L'analyse de la température optimale de la lipase LipIAF5-2 immobilisée était inférieure de 20°C à ce qui a été rapporté précédemment pour l'enzyme libre [160]. De plus, les tests de thermostabilité de la forme WCB ont démontré une plus grande thermolabilité avec une perte totale de toute activité résiduelle suite à 1h d'incubation à 80°C en milieu aqueux. Ceci contraste fortement avec une activité résiduelle d'environ 75% après 4 heures à 90°C pour la forme libre [221]. Il faut cependant souligner le caractère discutable de la qualité des données expérimentales employées pour ce test de thermostabilité de la forme sécrétée. En effet, les données employées étaient en deçà de la marge d'erreur de l'appareil avec des mesures basées sur une valeur initiale de 0,007 unités d'absorbance à 405 nm et des écarts de 0,003 unités d'absorbance [221]. Ceci est difficilement significatif et ces tests devront être repris avant de pouvoir conclure sur à la thermostabilité de la forme libre de la lipase LipIAF5-2.

L'écart rapporté au niveau de la température optimale entre la forme immobilisée et la forme libre peut s'expliquer par l'utilisation de substrats différents. Il a été rapporté que certains substrats ont un effet protecteur sur les enzymes, ce qui peut modifier leur température optimale apparente [46]. Une autre explication pourrait provenir de la présence de l'étiquette poly-histidines en N-terminal. L'ajout de telles étiquettes peut affecter négativement la structure, la flexibilité et l'activité biologique d'enzymes recombinantes [237]. Verger et collaborateurs ont observé une baisse de 10°C de la température optimale de la lipase SAL3 de *Staphylococcus aureus* et une augmentation de la thermolabilité lorsque une étiquette polyhistidines était ajoutée en N-terminal [237, 238]. Qui plus est, ils ont aussi observé que l'expression recombinante hétérologue chez *E. coli* de plusieurs lipases staphylococcales sans étiquettes donnait des protéines plus thermolabiles avec des températures optimales plus basses comparativement à leurs formes exprimées dans des systèmes homologues [238]. Ceci revient à dire que le simple fait d'exprimer de façon hétérologue une enzyme recombinante peut affecter ses caractéristiques biochimiques. Ceci pourrait aussi expliquer la différence de préférence pour des substrats ayant des chaînes de 8 carbones ou moins comparativement à ce qui a été rapporté pour la forme native exprimée chez *S. lividans* [160]. Des études de dichroïsme circulaire entre la forme sécrétée chez *S. lividans*, la forme intracellulaire sans étiquette chez *E. coli* et la forme recombinante avec étiquette pourraient peut être apporter des pistes de solution quant aux causes des écarts observés à propos de la thermolabilité et de la spécificité de cette lipase.

L'immobilisation intracellulaire a permis de créer un biocatalyseur à cellules entières (WCB) capable de synthétiser plusieurs esters à chaînes courtes pouvant servir d'arômes. Bien qu'il ait été impossible de comparer la forme libre de l'enzyme avec la forme immobilisée pour la synthèse organique, le WCB a démontré une remarquable capacité à effectuer des réactions de synthèse en présence de fortes concentrations de méthanol (jusqu'à 10 M) et d'acides carboxyliques courts (jusqu'à 1 M). L'absence d'activité de la forme libre peut être due à une dénaturation de l'enzyme lors du processus

de lyophilisation [239]. Gupta et collaborateurs ont aussi observé une faible activité de synthèse organique entre la forme libre et lyophilisée de la RML et sa forme immobilisée. Ils ont suggéré de déshydrater l'enzyme libre avec du *n*-propanol plutôt que d'employer la lyophilisation [240]. Ceci pourrait s'appliquer à LipIAF5-2 qui a déjà démontré une hyperactivation en présence de fortes concentrations d'isopropanol (voir Tableau 3.1) [221]. À notre connaissance, seule la lipase A de *Proteus* sp. SW1 et les lipases du genre *Burkholderia/Pseudomonas* ont une tolérance et une efficacité de synthèse similaires à celles que nous avons rapportés pour des concentrations aussi élevées de méthanol [64, 66]. La sensibilité des lipases pour le méthanol varie grandement d'une enzyme à l'autre et ne semble pas être corrélée à d'autres résistances comme la thermostabilité [66]. Ceci complique la prédiction de la susceptibilité d'une enzyme à cet alcool. Des stratégies d'immobilisation ou d'ajout graduel de méthanol doivent donc être développées afin d'optimiser ce facteur pour chaque enzyme [29]. En général, la concentration de méthanol est gardée en deçà du ratio molaire 1,5 :1 (méthanol /donneur d'acyle) afin d'atteindre des rendements de synthèse acceptables [11, 29, 110]. L'efficacité de la lipase LipIAF5-2 WCB dans des conditions beaucoup plus sévères permet d'envisager la synthèse d'esters de méthyle sans l'ajout graduel de l'alcool, ce qui est un avantage important pour les applications industrielles [29].

Tout comme pour l'approche d'immobilisation, la sélection du type de solvant affecte grandement l'activité des lipases en conditions de microhydratation [239]. Il est ainsi possible de moduler l'activité, la thermostabilité et même la stéréosélectivité des lipases par le type de solvant employé. Les solvants confèrent aux lipases une rigidité qui les emprisonne dans une conformation cinétique particulière [239]. Les propriétés apolaires des solvants organiques peuvent aussi moduler l'activation des lipases par une exposition des résidus hydrophobes à leur surface, simulant l'activation interfaciale de l'enzyme [35]. L'autre avantage indéniable des solvants est la possibilité de dissoudre des réactifs immiscibles (ex. le méthanol et des triglycérides) afin de former un système homogène favorisant les transferts de masse [239]. Il reste que dans les réactions de

synthèses d'esters alimentaires, il est préférable d'éviter la présence de solvants organiques afin de réduire la contamination par des résidus de produits toxiques [241]. L'utilisation de *tert*-butanol pour la biosynthèse d'esters avec LipIAF5-2 WCB est basée sur l'observation initiale de deux phases immiscibles dans les systèmes sans solvant (G. Brault, non-publié). Le *tert*-butanol a été choisi pour son point d'ébullition différent des esters synthétisés facilitant ainsi la purification des arômes par distillation (voir Tableau 3.2). La distillation reste de loin la technique la plus employée par l'industrie pour produire à grande échelle des arômes et fragrances [242]. De plus, le coût du *tert*-butanol est relativement faible et son encombrement stérique l'empêche de servir d'accepteur d'acyle contrairement à d'autres solvants de faible point d'ébullition comme l'acétate d'éthyle. Bien que le *sec*-octanol offrait une meilleure activité enzymatique, le *tert*-butanol a été favorisé car il est totalement miscible avec l'eau, les alcools et les acides carboxyliques employés dans la synthèse d'arômes. Enfin, de nombreuses études ont souligné l'efficacité de ce solvant dans la réduction de l'inactivation des lipases par les alcools [63, 201, 243]. L'efficacité de synthèse en mini-réacteur semble confirmer le choix de ce solvant avec près de 100% de conversion de 50 mmol de glycéryle triacétate en acétate d'isoamyle en 24h. Knez et collaborateurs ont obtenu seulement 50% de conversion en 24h pour la transestérification de l'acétate d'éthyle en acétate d'isoamyle avec l'hexane comme co-solvant et la lipase commerciale Novozyme 435 [244]. Dans une autre étude cependant, ils ont obtenu 100% de conversion avec l'utilisation de faibles concentrations d'acide acétique anhydre comme donneur d'acyle. Cependant, l'utilisation de concentrations supérieures à 0.2 M inhibait fortement l'enzyme [245]. Karanth et collaborateurs ont employés une autre lipase commerciale importante, la Lipozyme IM-20 (lipase RML) pour produire de l'acétate d'isoamyle par estérification de l'acide acétique en présence de *n*-heptane [246]. Ils ont aussi observé une susceptibilité du biocatalyseur à l'acide acétique et n'ont pu obtenir des taux de conversion supérieurs à 95% qu'avec des concentrations d'acide inférieures à 60 mM. Une augmentation de la concentration d'acide acétique à 0.3 M réduisait le taux de synthèse à 12% en 72h. Étant donné que LipIAF5-2 WCB a démontré la même activité à

0.5 et 1 M d'acide acétique, il serait intéressant d'évaluer les rendements d'estérification à partir de ce substrat en mini-réacteur afin de pouvoir comparer les rendements obtenus avec ceux rapportés dans la littérature.

Tableau 3.2. Températures d'ébullition des esters sélectionnés.

Nom du composé	Température d'ébullition ⁽¹⁾ (°C)
Méthyle acétate	56,9
Méthyle butyrate	102
Méthyle hexanoate	150-151
Méthyl octanoate	194
Éthyle butyrate	121
Propyle butyrate	148
Butyle butyrate	165
Pentyle butyrate	185-186
Isoamyle acétate	142
<i>tert</i> -butanol	82,2

⁽¹⁾ Données provenant du site www.chemspider.com

La perméabilisation du biocatalyseur WCB s'est avérée essentielle afin d'obtenir des rendements d'activité acceptables. Plusieurs études ont mentionné la nature restrictive des membranes plasmiques à divers composés hydrophiles et hydrophobes [247]. Bien que cela rajoute une étape, la simplicité du processus permet tout de même d'envisager son application à grande échelle. Cependant, il serait intéressant de trouver un agent perméabilisant moins onéreux que le CTAB, un surfactant cationique de la classe des ammoniums quaternaires. Des questionnements sur la persistance et la toxicité environnementale de ces composés antimicrobiens pourraient aussi remettre en cause l'utilisation du CTAB selon un cadre de chimie verte [248]. Il est possible d'employer d'autres agents perméabilisant pour préparer le biocatalyseur WCB. Iborra et collaborateurs ont étudié l'effet de huit agents de perméabilisation chez *E. coli* [113]. Ils ont aussi testé l'impact du temps d'exposition des cellules aux agents perméabilisant ainsi que l'effet de la température sur la perméabilisation. Ils ont observés une hausse significative de l'activité catalytique des cellules lorsque traitées seulement dix minutes avec des concentrations relativement faibles de solvants comme l'éthanol, l'isopropanol, l'acétone ou le toluène. Les traitements avec des détergents comme le Tween-20 ou le

Triton X-100 se sont avérés encore plus probants. Ceci laisse entrevoir l'utilisation d'agents de perméabilisation plus adéquats à une production de biocatalyseur WCB à grande échelle selon un principe de chimie verte.

Le choix du type de bioréacteur a une grande influence sur les rendements de synthèse organique. Les cellules ont été immobilisées dans un bioréacteur à lit fluidisé (FBR), c'est-à-dire une colonne avec un volume mort au dessus des cellules. Ceci permet d'agiter les cellules en pompant le milieu réactionnel à contresens et limite les problèmes de transfert de masse observés avec les bioréacteurs à lit fixe [29, 34]. Cependant, pour qu'un FBR fonctionne adéquatement, la masse du support d'immobilisation doit faire redescendre les particules par gravité contre le courant de pompage, créant ainsi une agitation constante [249]. Dans notre cas, la masse des cellules individuelles ne semblait pas assez suffisante pour créer cette agitation et il a été observé que les cellules avaient tendance à s'agglomérer à la surface du filtre supérieur. L'immobilisation des cellules sur des matrices plus volumineuses pourrait régler ce problème, mais cela ajouterait au coûts d'immobilisation du biocatalyseur [250]. Bien qu'aucune surpression n'ait été observée avec le système employé, l'utilisation de cellules de 1-2 μm de diamètre et de filtres de 0.22 μm de porosité pour les retenir peut s'avérer un problème à grande échelle [81, 87]. La viscosité de certains substrats et les débits nécessaires à une production à grande échelle pourraient créer des problèmes de surpression [29]. Des essais de mise à l'échelle avec un réacteur de 1L et de 10L seront nécessaires afin d'évaluer le potentiel d'application à grande échelle.

La réutilisation d'un biocatalyseur est le facteur majeur affectant sa compétitivité par rapport aux techniques de catalyse chimique [29]. Bien que l'utilisation de poudres de lipases lyophilisées soit relativement efficace, l'immobilisation des enzymes s'avère tout de même nécessaire pour faciliter leur récupération à grande échelle [251]. L'immobilisation intracellulaire de LipIAF5-2 s'est avérée efficace avec près de 100% de conversion du substrat en acétate d'isoamyle au premier cycle. Néanmoins, le taux de conversion a diminué rapidement à chaque cycle de synthèse pour n'atteindre que 50% au

cinquième cycle. Fukuda et collaborateurs ont observé le même phénomène avec l'utilisation de cellules entières de *R. oryzae* pour la synthèse de biodiesel. Ils ont conclu à un lessivage des lipases intracellulaires et à une inactivation par le méthanol. Un prétraitement des cellules par une faible concentration de glutaraldéhyde (0.1% v/v) a permis de garder l'activité initiale pendant 11 cycles [118]. Il serait intéressant de comparer la stabilité du biocatalyseur LipIAF5-2 WCB traité avec du glutaraldéhyde dans les mêmes conditions de synthèse. Alternativement, Li et collaborateurs ont suggéré qu'il suffit de compenser la perte d'activité par l'ajout de petites quantités de cellules fraîches à chaque cycle [105, 107]. Une voie intéressante serait l'immobilisation intracellulaire des lipases *via* la fusion avec des peptides polaires. Kolmar et collaborateurs ont réussi à immobiliser sur des corps d'inclusions une galactose oxydase exprimant en C-terminal un peptide chargé négativement. Les corps d'inclusion étaient formés d'une protéine exprimant une hélice alpha chargée positivement [252]. Une telle approche pourrait peut-être assurer la fixation des lipases de façon intracellulaire afin de réduire leur lessivage en milieu organique.

3.7 Résultats supplémentaires

3.7.1. Introduction

Cette section rassemble des résultats qui n'ont pas été publiés dans le 2^e article. Ils sont présentés afin de compléter la thèse sur les biocatalyseurs immobilisés en cellule entière. Une discussion comprenant ces résultats a donc été rajoutée afin de faire ressortir certains éléments intéressants.

3.7.2. Criblages fonctionnels préliminaires des enzymes provenant de l'étude métagénomique

Le criblage initial de la banque d'enzymes lipolytiques semblait suggérer que les protéines provenant de *S. coelicolor* n'avaient que peu de potentiel d'applications de

synthèse d'esters d'acides carboxyliques (voir section 2.6, chapitre 2). Cette assumption se basait sur les plages d'hydrolyse des clones cultivés sur géloses fonctionnelles et sur l'analyse par zymogramme des fractions cytoplasmiques (voir Figure A1, Annexe II et Figure A3, Annexe III respectivement). Le même principe a été appliqué afin de cribler d'autres lipases identifiées lors de l'étude métagénomique mentionnée précédemment (voir section 3.1.1, chapitre 3). Le criblage initial des ces clones sur géloses sélectives indique que seules les protéines LipIAF5-2 et LipIAF1-6 ont réellement une activité lipolytique significative en présence de tributyrine (Figure A3, Annexe V). Par contre, une analyse plus fine de l'activité hydrolytique des fractions cytoplasmiques démontre que les enzymes LipIAF1-6, LipIAF1-1, LipF5-11 et LipIAF5-2 ont une bonne activité hydrolytique envers le MUF-butyrate (Figure A4, Annexe V). Tout comme pour le gène *lipIAF5-2*, l'expression intracellulaire des enzymes sans leur peptide de sécrétion a permis d'obtenir de bonnes productions recombinantes. La lipase LipIAF1-1 est fortement exprimée sous forme soluble alors que les lipases LipIAF1-6 et LipIAF5-2 sont exprimées de façon relativement égale entre la forme soluble et insoluble. Tout comme pour la lipase LipIAF5-2, l'expression intracellulaire de LipIAF1-6 constitue un gain significatif au niveau des rendements de production recombinante par rapport à ce qui a publié antérieurement [162, 220]. Ceci semble confirmer l'efficacité de la stratégie de l'approche intracellulaire pour produire des enzymes au potentiel d'applications industrielles. Cependant, les protéines recombinantes LipF1-14 et LipF5-11 se sont avérées très peu exprimées sous forme soluble avec des protéines à peines détectables visuellement sur gel de polyacrylamide (Figure A4, Annexe V). Il est cependant intéressant de constater la très forte activité hydrolytique de la forme soluble de LipF5-11 en zymogramme, ce qui suggère une spécificité très élevée envers les esters de MUF. De plus, il est intéressant de constater que les formes insolubles correspondant aux corps d'inclusion sont biologiquement actives, surtout pour les protéines LipIAF1-6 et LipIAF5-2. Ceci semble suggérer que la lipase LipIAF1-6 immobilisée de façon intracellulaire serait aussi une bonne candidate pour la biosynthèse d'esters d'acides carboxyliques.

Tout comme pour la lipase LipIAF5-2, la faible activité hydrolytique de la souche LipIAF1-6 par rapport au glycéryl trioctanoate et à l'huile d'olive suggère que la spécificité de cette lipase serait pour les triglycérides à chaînes courtes (voir Figure A3, Annexe V). La caractérisation de LipIAF1-6 avec des esters de *p*-NP dans une autre étude avait démontré une activité optimale pour les esters d'acide butyrique (C4 :0) et d'acide valérique (C5 :0), ce qui semble concorder avec les données obtenues chez *E. coli* [220]. Néanmoins, cette étude a aussi démontré que cette lipase conservait plus de 50% d'activité relative pour les chaînes acyles de 8 carbones et plus [162]. Ces données suggèrent qu'une activité hydrolytique significative aurait dû être observée sur les géloses trioctanoate et huile d'olive, activité qui n'a pas été observée avec l'expression chez *E. coli*. Ceci tend à souligner l'importance de faire des tests de criblage avec des substrats qui ressemblent à ceux qui seront employés pour les réactions de biosynthèse. Mateos-Diaz et collaborateurs ont d'ailleurs suggéré de cribler les lipases en fonction de cette prémisse afin d'éviter des erreurs dans l'évaluation de la sélectivité des enzymes testées [253]. Basé sur ce principe, l'ensemble de la banque lipolytique a été testé de nouveau pour l'hydrolyse d'esters aromatisants importants mais ayant des structures chimiques variées.

3.7.3 Criblage fonctionnel de la banque lipolytique pour l'affinité envers des arômes et fragrances reconnus

Les résultats de criblage de la banque lipolytique pour la détection d'activité hydrolytique d'esters aromatisants sont présentés dans la Figure A5 (Annexe V). Les esters ont été sélectionnés pour leur diversité de structure chimique plutôt que pour leurs propriétés organoleptiques plaisantes. La lipase LipIAF5-2 semble de loin l'enzyme la plus versatile avec une capacité d'hydrolyser 16 des 18 esters testés. Elle est d'ailleurs la seule à avoir démontré une zone d'hydrolyse pour l'acétate de linallyle même si la zone était très faible et difficilement visible sur la Figure A5 (Annex V). Néanmoins, la versatilité de l'affinité catalytique de la lipase LipIAF5-2 semble confirmer qu'il s'agit d'une excellente candidate pour produire d'autres arômes que l'acétate d'isoamyle. De

plus, la lipase LipIAF1-6 semble aussi très intéressante avec des activités marquées pour les esters de butyrate. Elle présente aussi une faible activité pour le benzoate de méthyle, la plus petite des molécules de la classe des parabènes, des agents de conservation très employés dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique [254]. Il est aussi intéressant de noter que la protéine SC4B10.32 de *S. coelicolor* a aussi une bonne activité hydrolytique envers des esters d'acétate comme l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle et l'acétate de benzyle. Étant fortement exprimée sous forme soluble chez *E. coli* (voir Figure A2, Annexe III), il serait intéressant de tester son efficacité de synthèse en catalyseur WCB pour des esters d'acétate, des esters reconnus pour être difficiles à obtenir par biocatalyse [246]. Ces résultats encourageants suggèrent qu'il pourrait être possible d'employer des combinaisons de biocatalyseurs WCB afin d'optimiser la production de certains esters importants. Il reste cependant bien des tests de caractérisation à effectuer avant de pouvoir conclure de l'efficacité de ces différents biocatalyseurs.

Suite à ces résultats prometteurs, des tests préliminaires de synthèse de méthyle butyrate par transestérification ont été menés avec les formes WCB de ces lipases (Figure A6, Annexe V). La lipase LipF1-14 n'a pas été testée étant donné les faibles niveaux d'expression recombinante et l'absence d'activité en zymogramme (Figures A3, A4 et A5, Annexe V). Pour les autres candidates, les cellules recombinantes ont été traitées et employées selon les conditions déterminées pour LipIAF5-2. Les lipases LipIAF1-1 et LipF5-11 ont démontré une activité de synthèse très faible en milieu organique. Par contre, la lipase LipIAF1-6 s'est avérée fort intéressante, car plus efficace que la lipase LipIAF5-2 pour la transestérification de la tributyrine en butyrate de méthyle. Des tests de caractérisation biochimique avec la lipase LipIAF1-6 purifiée envers des substrats naturels devront cependant être menés afin de pouvoir comparer son efficacité catalytique, sa spécificité et sa stabilité par rapport à LipIAF5-2. Les enzymes lipolytiques de *S. coelicolor* SCF42.23c (LipA) et SC6F7.19c (EstB) ont aussi été exprimées de façon intracellulaire étant donnée l'activité biologique observée provenant des fractions correspondant aux corps d'inclusions (Figure A2, Annexe III). Les tests de

synthèse de butyrate de méthyle par transestérification n'ont donné aucune conversion du triglycéride après trois heures d'incubation. Ceci diffère de ce qui a été rapporté pour la lipase SCF42.23c exprimée de façon extracellulaire chez *S. lividans* [200]. Cependant, les résultats rapportés ne concernaient que l'hydrolyse de la tributyrine en milieu solide. Des tests plus poussés devront être menés afin de discriminer si cette disparité provient de l'expression hétérologue chez *E. coli* tel que rapporté par Sayari et collaborateurs [237].

3.7.4. Évaluation du potentiel d'application industrielle des WCB

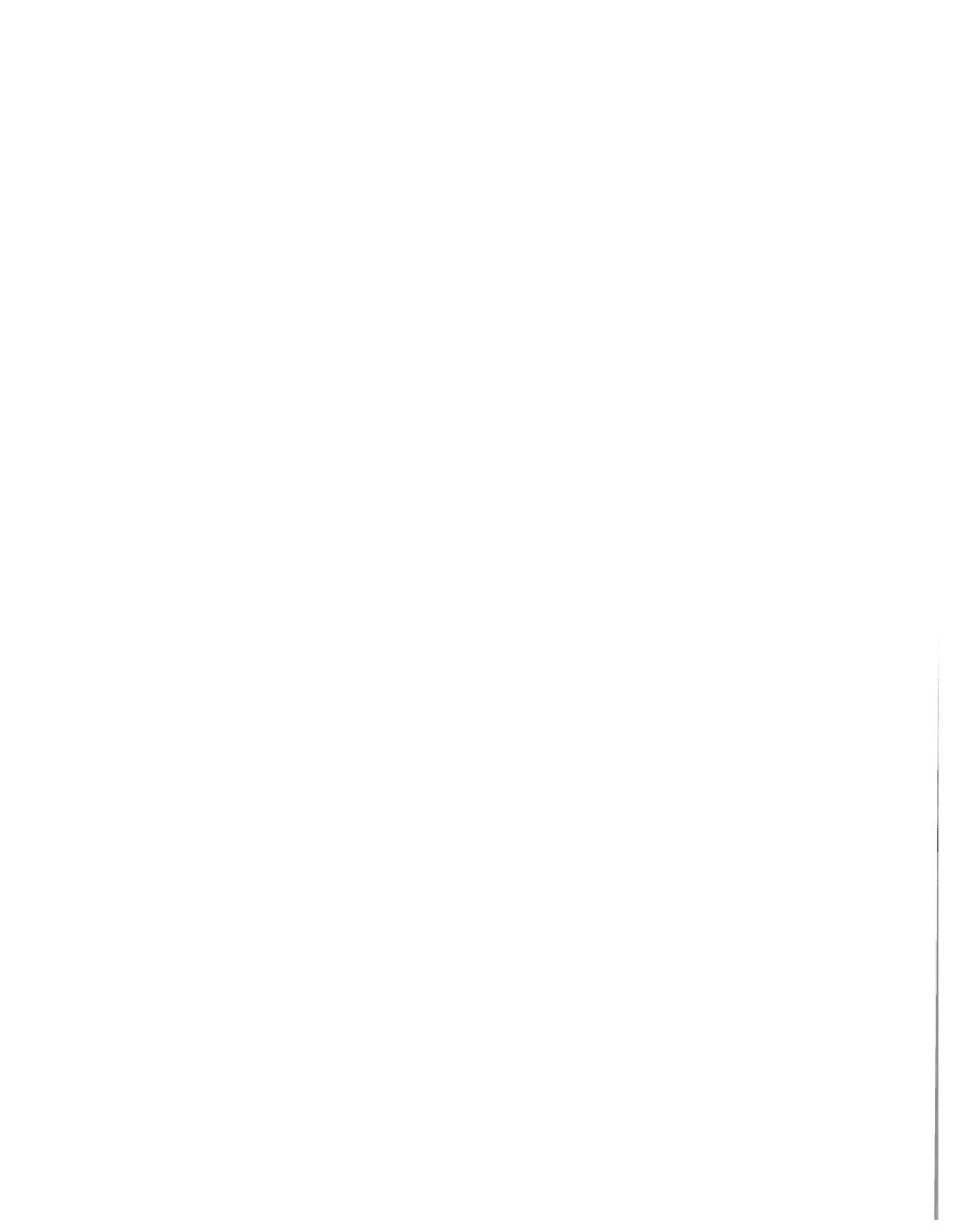
Les biocatalyseurs WCB testés ont été produits en 24h dans un milieu riche Luria-Bertani classique sans ajout d'antibiotique. La production de grandes quantités de protéines recombinantes en peu de temps est essentielle pour envisager des applications à grande échelle. Le fait de pouvoir exprimer et immobiliser en même temps les protéines recombinantes *via* une simple fermentation constitue un avantage indéniable par rapport aux autres techniques d'immobilisation et constitue un outil intéressant en vue d'applications à grande échelle [29, 70]. Il est cependant essentiel de pouvoir effectuer ces fermentations au plus bas coût possible. C'est dans cette optique que l'expression de la lipase LipIAF5-2 a été testée en milieux riches et minimaux avec deux sources de carbone différentes. Bien que ces résultats soient préliminaires, l'expression de la lipase LipIAF5-2 s'est avérée tout aussi efficace en milieu riche qu'en milieu minimal (voir Figure A7, Annexe VI). Qui plus est, à concentration cellulaire équivalente, l'expression en milieu minimal M9 contenant 0.4% (p/v) de glucose était relativement semblable à celle obtenue en milieu M9 contenant 2% (p/v) de glycérol comme source de carbone. Ceci permet d'envisager l'utilisation de glycérol comme source de carbone pour les fermentations, un composé qui a l'avantage d'être moins onéreux que le glucose grâce aux surplus produits sur les marchés par les industries du biodiesel [255]. Il faut toutefois mentionner que la croissance cellulaire était beaucoup plus lente en milieu M9-glycérol comparativement aux autres milieux testés (résultats non-présentés). Ceci permet néanmoins d'envisager la culture de la souche recombinante en fermenteur avec un milieu minimal afin de réduire d'avantage les coûts de production du biocatalyseur. Des tests de

mise à l'échelle en fermenteurs restent cependant à faire avant de pouvoir évaluer les coûts de production des biocatalyseurs WCB.

Outre les conditions de fermentation, l'étape essentielle de la perméabilisation des cellules pourrait constituer à grande échelle une étape potentiellement coûteuse et polluante. On peut se questionner sur ce qu'il adviendrait, une fois les cellules traitées, des rejets contenant 0.3% (p/v) de CTAB. Il est vraisemblable de croire qu'une fois décontaminés, ces rejets se ramasseraient dans l'environnement. Cette approche, quoique très efficace, gagnerait à être optimisée afin de réduire au minimum ces coûts ainsi que les impacts environnementaux potentiels. L'étape de perméabilisation est essentielle à cause de la nature amphiphile des lipopolysaccharides qui forment la membrane externe des cellules. Cette couche lipidique est imperméable aux macromolécules hydrophiles et relativement imperméable aux composés hydrophobes [113, 256]. La diffusion passive de molécules hydrophobes y est donc relativement lente [257]. Il est donc crucial de perméabiliser partiellement la membrane externe, sans toutefois provoquer la lyse cellulaire, afin d'augmenter les échanges entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme des cellules contenant les enzymes recombinantes [247]. Plusieurs agents chimiques sont reconnus pour affecter l'intégrité de la membrane externe, mais l'efficacité de la perméabilisation des cellules varie en fonction de l'organisme et de la technique employée. Chaque combinaison doit donc être optimisée empiriquement [247]. C'est dans cette optique que les conditions optimales déterminées par Iborra et collaborateurs pour la perméabilisation de cellules de *E. coli* ont été employées comme lignes directrices. L'impact de huit agents perméabilisant sur les cellules de LipIAF5-2 a été testé avec des résultats intéressants (Figure A8, Annexe VI). En effet, les résultats démontrent un gain d'activité significatif avec l'utilisation du Tween-20, de l'isopropanol et de l'acétone par rapport au CTAB. L'utilisation du Tween-20 (polysorbate 20) est particulièrement intéressante car ce composé est couramment employé industriellement comme détergent, surfactant, émoullient et agent émulsifiant dans de nombreux produits domestiques, alimentaires, scientifiques et pharmacologiques [258]. De plus, il est peu coûteux et est reconnu pour n'avoir qu'une faible toxicité et ne présenter aucune persistance

environnementale. L'augmentation substantielle d'activité synthétique observée avec le Tween-20 permet d'envisager de réduire le temps de réaction pour la synthèse d'arômes, ce qui augmente la compétitivité du biocatalyseur WCB. Il reste cependant à employer ce biocatalyseur optimisé pour faire des réactions de synthèse en mini-bioréacteur afin de pouvoir mesurer son efficacité et sa stabilité. Des tests préliminaires avec la lipase LipAIF1-6 ont démontrés quant à eux que c'est le Triton X-100 qui était le meilleur agent perméabilisant (Figure A9, Annexe VI). Ceci suggère que l'efficacité des agents perméabilisant serait peut-être enzyme-dépendante. L'une des explication à ce phénomène serait la susceptibilité de certaines lipases à certains des agents perméabilisant employés. Par exemple, dans une étude publiée antérieurement, la LipIAF5-2 a été complètement désactivée en présence de 1% (v/v) de Triton X-100, mais pas en présence de 1% (v/v) de Tween-20 [221]. Il semble donc que des recherches empiriques doivent être menées pour l'optimisation de la perméabilisation de chaque lipase immobilisée de façon intracellulaire. Ceci pourrait peut-être compliquer l'utilisation à grande échelle de types variés de biocatalyseurs WCB. Des recherches plus poussées devront être menées afin de répondre à cette problématique.

Chapitre 4. Perspectives et conclusion



4.1 Perspectives

4.1.1. La modification semi-rationnelle des lipases

L'utilisation d'enzymes lipolytiques pour la production d'esters de faible valeur ajoutée requiert un système d'expression simple, efficace et peu onéreux. De plus, ce système doit être couplé à un mode d'immobilisation tout aussi simple et efficace. La performance de l'enzyme ne doit pas être altérée par le processus d'immobilisation et doit permettre la synthèse des esters dans des conditions acceptables pour les industries, à savoir, des rendements de conversion élevés, la possibilité de réutiliser un maximum de fois les biocatalyseurs, la possibilité d'employer des co-solvants et des temps de réaction relativement courts. L'utilisation de cellules entières semble constituer une approche capable de répondre à ces critères et ce, même si des travaux d'optimisation devront être menés au niveau de la fermentation des cellules ainsi que sur la stabilité des biocatalyseurs. Ces travaux devront aussi être accompagnés par un développement en parallèle des enzymes afin de mieux répondre à des besoins industriels précis.

Bien que les criblages génétiques d'organismes versatiles et de banques métagénomiques constituent des approches efficaces pour la découverte de nouvelles enzymes, il arrive que cette diversité ne soit pas suffisante pour répondre à des besoins particuliers. Le principal obstacle à l'utilisation de cette approche est le temps requis et l'incertitude de l'efficacité de l'expression hétérologue des gènes découverts. L'efficacité d'expression constitue souvent une étape limitante dans l'application d'un biocatalyseur. Dans ces conditions, certaines entreprises privilégient l'ingénierie d'enzymes facilement exprimées à des niveaux industriels. Par exemple, une compagnie pourrait être intéressée à exploiter l'efficacité du biocatalyseur LipIAF5-2 WCB pour produire des surfactants ou bien des esters particuliers de glycérol, voir du biodiesel. Bien que la lipase LipIAF5-2 soit capable d'hydrolyser les triglycérides à chaînes longues, son efficacité reste relativement faible comparativement à d'autres lipases commerciales brevetées. La synthèse de biodiesel par la lipase LipIAF5-2 impliquerait forcément des études

intensives de mutagenèse rationnelle ou aléatoire afin d'en augmenter l'affinité envers les substrats à chaîne longue. Le même principe pourrait être appliqué pour améliorer l'efficacité catalytique de la lipase LipIAF5-2 pour la synthèse de molécules ayant des propriétés organoleptiques très prisées comme la vanille ou la lavande. Une approche permettant de modifier rapidement et efficacement une enzyme pour chaque cible impliquerait par contre de connaître au minimum la structure tridimensionnelle de l'enzyme en question afin d'optimiser les chances de succès. Ainsi, il serait intéressant d'obtenir la structure tridimensionnelle des lipases employées dans la présente étude, ou du moins des simulations de structures convaincantes par homologie de modèles.

Bien des techniques ont été développées pour la modification aléatoire ou rationnelle d'enzymes, mais l'approche qui semble la plus efficace est une combinaison de ces deux techniques [38]. La force de cette approche dite combinatoire consiste à identifier des régions clés dans l'activité enzymatique, des «hot spots», et à muter aléatoirement ces régions plutôt que de cibler aléatoirement l'ensemble d'une protéine. L'identification de ces régions importantes se fait à partir des données de la littérature provenant d'études structurales et fonctionnelles de mutants, mais peut aussi être obtenue à partir d'alignements de séquences et de structures. Il reste que la majorité des mutations affectant les propriétés catalytiques d'une enzyme sont souvent concentrées à proximité ou au sein même du site actif de l'enzyme [61]. L'approche combinatoire peut donc réduire substantiellement le nombre de mutants à cribler afin d'obtenir un gain d'efficacité comparativement aux approches d'évolution dirigée classiques [259]. De plus, avec les progrès de la bioinformatique, il est maintenant possible de réduire substantiellement la taille des bibliothèques fonctionnelles grâce à un criblage *in silico* des mutants générés [61, 260]. L'avantage de l'approche *in silico* est de pouvoir évaluer virtuellement la stabilité de chaque mutant avant même de faire une seule étape de clonage et d'expression, sauvant ainsi beaucoup de temps et de labeur. La versatilité de la simulation va jusqu'à permettre des combinaisons complexes de mutations qu'il serait impossible de tester dans une étude rationnelle classique. Par exemple, la topologie du

site actif de la lipase A de *Candida antarctica* (CALA) a été drastiquement modifiée par la mutation simultanée de neuf résidus afin d'augmenter (avec succès) son énantiosélectivité pour l'ibuprofène [261]. La même approche a été aussi appliquée pour la modification de l'affinité de la lipase industrielle CALB envers les acides gras ramifiés [262]. Le criblage de la librairie virtuelle a permis d'identifier neuf mutants des 2400 initialement produits par la saturation des zones ciblées comme ayant une bonne combinaison affinité/stabilité. Un de ces clone a démontré une augmentation par un facteur cinq de l'activité synthétique de l'enzyme. Bien qu'il reste encore beaucoup de recherche à faire dans ce domaine, l'approche combinatoire semble très prometteuse pour envisager la modification d'enzymes en fonction de besoins industriels précis et laisse même entrevoir la possibilité de développer des biocatalyseurs ciblés pour des réactions de synthèse que l'on ne retrouve pas dans la nature.

4.1.2. La fermentation à haute densité cellulaire et l'amélioration des vecteurs d'expression

L'utilisation compétitive de l'expression intracellulaire chez *E. coli* ne sera possible que si cette approche permet la production en grande quantité de molécules de faible valeur ajoutée, à savoir les lipases. Bien que *E. coli* a surtout été employée pour la production de molécules à haute valeur ajoutée, les progrès récents des techniques de fermentation permettent maintenant d'obtenir des densités cellulaires adaptées à la production rentable de molécules de faible valeur ajoutée [263]. La possibilité de cultiver *E. coli* à de très hautes densités cellulaires (HCDCs), dépassant les 100 grammes de biomasse humide par litre de culture est un atout majeur pour répondre à cette exigence [214, 263]. Les techniques de HCDCs permettent de réduire les coûts et les impacts environnementaux associés à la production des cellules recombinantes [214]. De plus, l'utilisation à l'échelle industrielle de HCDCs est particulièrement bien adaptée à l'expression intracellulaire de protéines recombinantes. En fait, la majorité des succès industriels d'expression recombinante à grande échelle emploient l'expression intracellulaire (résumés dans [214]). Ceci en fait une technique de choix pour produire

des WCB à faible coût. Le développement de techniques de fermentation à haute densité des WCB devra être étudié afin de pouvoir évaluer le potentiel commercial de l'utilisation de cellules entières pour la production biologique d'esters.

Bien que prometteuse, la culture de cellules à haute densité provoque souvent une réduction des rendements d'expression spécifique [214, 263]. Cette baisse de rendement serait attribuable à un stress cellulaire induit par des manques de nutriments et par la surexpression de protéines recombinantes [214]. Il a été démontré que la surexpression recombinante en HCDCs provoque une baisse de production de facteurs de division cellulaire qui induit une filamentation des cellules, c'est à dire une multiplication sans division cellulaire [263]. La filamentation réduit significativement les rendements d'expression et augmente la mortalité cellulaire. Afin de minimiser ce stress, il est important d'avoir des systèmes d'expression inductible performants. La vaste majorité des systèmes commerciaux emploient des vecteurs basés sur les systèmes T7 puissants qui sont de type «on/off» sans réelle modulation entre ces deux états [264]. Ces systèmes sont reconnus pour produire beaucoup de protéines recombinantes, mais aussi pour avoir tendance aux fuites, c'est-à-dire à l'expression en absence d'inducteur. De plus, l'utilisation d'IPTG comme inducteur principal de ces systèmes est à éviter pour la production à grande échelle en raison de son coût élevé et de sa toxicité inhérente. Plusieurs études ont rapporté la toxicité cellulaire de l'IPTG même à des concentrations de l'ordre de 100 μM [265-267]. L'utilisation de systèmes alternatifs inductibles et hautement régulés est essentielle pour envisager la production de masse à bas coût de biocatalyseurs WCB. Miguez et collaborateurs ont élégamment adapté le système de régulation par le cumate (benzoate de *para*-isopropyle) de *Pseudomonas putida* F1 pour l'expression hétérologue chez *E. coli* [268]. L'utilisation de ce type de système inductible s'est avérée plus performante comparativement au système T7 en termes de quantité de protéines exprimées ainsi que de la qualité du contrôle de l'expression. L'induction au cumate ne présentait aucune fuite, était parfaitement corrélée à la concentration de l'inducteur en plus de nécessiter dix fois moins d'inducteur (typiquement 100 μM)

comparativement aux systèmes d'induction à l'IPTG. Ces facteurs sont importants lorsqu'on envisage des productions à grande échelle. De plus, l'application de ce système en culture à haute densité s'est avérée plus efficace que le système T7, avec une homogénéité dans l'induction des cellules et une absence de toxicité aux concentrations testées [268]. Les niveaux d'expression recombinante étaient de deux à trois fois supérieurs à ceux obtenus par le système T7 dans des conditions similaires. Qui plus est, la versatilité du vecteur a été testée efficacement pour plusieurs souches *E. coli* et pour l'expression de plusieurs gènes recombinants dont une estérase. L'utilisation d'un tel système d'expression avantageux serait un incontournable afin de pouvoir produire industriellement des lipases recombinantes chez *E. coli*. Combinée à la culture à haute densité, l'usage de vecteurs performants permettrait d'améliorer les niveaux de production du biocatalyseur et donc d'augmenter sa compétitivité par rapport aux techniques classiques de catalyse chimique.

4.2 Conclusion

Les lipases et estérases sont d'importants biocatalyseurs industriels. Leur utilisation à grande échelle dans plusieurs domaines économiques est en croissance constante. Ces enzymes offrent une voie alternative pour la production durable de molécules de synthèse employées dans tous les domaines de la vie courante. La possibilité de produire des esters d'intérêt de façon plus économique et respectueuse de l'environnement est très alléchante pour les industriels. Cependant, un dilemme persiste, car la production de masse d'esters selon un cadre de chimie verte requiert des biocatalyseurs performants et peu onéreux. Or, la plupart des protéines recombinantes issues de la biotechnologie sont des produits à haute valeur ajoutée en soi, ce qui les rend *de facto* non-compétitives par rapport aux approches industrielles classiques. Néanmoins, la forte demande pour la production de molécules ayant un label naturel stimule la recherche appliquée pour le développement de tels biocatalyseurs. Dans le cadre de ce projet de recherche, le criblage génétique d'un organisme versatile a été réalisé afin

d'identifier de nouvelles enzymes lipolytiques. Une nouvelle estérase psychrophile a été identifiée et caractérisée. Cependant, le potentiel d'application de cette enzyme ainsi que d'autres candidates s'est avéré limité, mais des études plus approfondies seront nécessaires afin d'identifier la spécificité réelle de ces enzymes.

L'approche développée pour cette étude de criblage a ouvert la porte au développement d'un système d'expression et d'immobilisation simple mais efficace. Ce système a été appliqué pour l'étude de lipases robustes provenant d'une étude métagénomique antérieure aux travaux présentés. L'application de cette approche a permis de valoriser le potentiel catalytique de ces enzymes à des niveaux suggérant des applications industrielles, ce qui n'était pas possible auparavant avec les systèmes recombinants employés. L'immobilisation intracellulaire a permis de synthétiser efficacement des esters volatiles reconnus comme étant des arômes et fragrances naturels importants. L'utilisation de ce biocatalyseur en mini-réacteur a aussi permis de le réutiliser à plusieurs reprises, un critère important pour les applications industrielles. Il reste cependant à optimiser la stabilité des enzymes et à tester les biocatalyseurs pour la synthèse de plusieurs autres arômes d'intérêt afin de pouvoir évaluer le potentiel d'application de cette approche. De plus, des réactions de synthèse à partir de biomasses naturelles devront être testées afin de pouvoir apposer une certification naturelle aux molécules produites.

Bien que prometteuses, plusieurs études d'optimisation restent à entreprendre afin de pouvoir produire industriellement et de façon compétitive des biocatalyseurs lipolytiques. L'utilisation de vecteurs d'expression inductibles et performants ainsi que le développement de techniques de cultures à haute densité seront essentiels pour y parvenir. Aussi, l'optimisation semi-rationnelle de lipases pour répondre aux exigences de plus en plus ciblées des industries sera un facteur déterminant dans l'intérêt porté par les industriels à ces catalyseurs issus de la biotechnologie.

Annexe I

Tableau A1 : Gènes sélectionnés suite au criblage génomique de *S. coelicolor*.

Nom du gène	Identification du gène (GI)	Accession	Masse moléculaire ⁽¹⁾ (Da)	Peptide signal de sécrétion ⁽²⁾	Référence
SCD19.23c	21222759 10129769	NP_628538 CAC08324	40518	Oui, résidus [1 à 36]	
SCD63A.10c	21223177 8218200	NP_628956 CAB92662	35138	Non	
SCE8.12c	21221654 4490628 21222759	NP_627433 CAB38590 NP_628538	41487	Oui, résidus [1 à 32]	
SCI11.24c	21220229 5531445 21219773	NP_626008 CAB50950 NP_625552	30496	Oui, résidus [1 à 30]	
SCF42.23c	21219239 6752329 4102170	NP_625018 CAB69685 AAD09315	32533	Oui, résidus [1 à 48]	[200]
SCF34.09	21219028 5763941	NP_624807 CAB53320	38823	Non	
SCI11.14c	21220219 5531435	NP_625998 CAB50940	27393	Oui, résidus [1 à 29]	[197, 198]
SCBAC25F8.05c	21225779 14495023	NP_631558 CAC42140	30494	Oui, résidus [1 à 31]	[198]
SC6F7.19c	21225253 7649552	NP_631032 CAB89027	28923	Non	[142]
SC6G4.24	21223125 3449258	NP_628904 CAA20402	43996	Non	

Tableau A1 (suite).

Nom du gène	Identification du gène (GI)	Accession	Masse moléculaire ⁽¹⁾ (Da)	Peptide signal de sécrétion ⁽²⁾	Référence
SC4B10.32	21225413 9885229	NP_631192 CAC04237	34103	Non	[199]
2SCG18.12c	21219773 9368913	NP_625552 CAB99145	31434	Non	
SC6E10.17	21220601 5689933	NP_626380 CAB51971	28531	Non	
SCH10.22c	21222059 4753868	NP_627838 CAB42031	31084	Non	
SCP8.28c	21223534 9714450	NP_629313 CAC01366	32145	Non	Ce travail

(1) Masses théoriques des protéines obtenues par traduction de la séquence déposée du gène.

(2) Sites de clivages obtenus avec le serveur Signal P v4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)

Annexe II

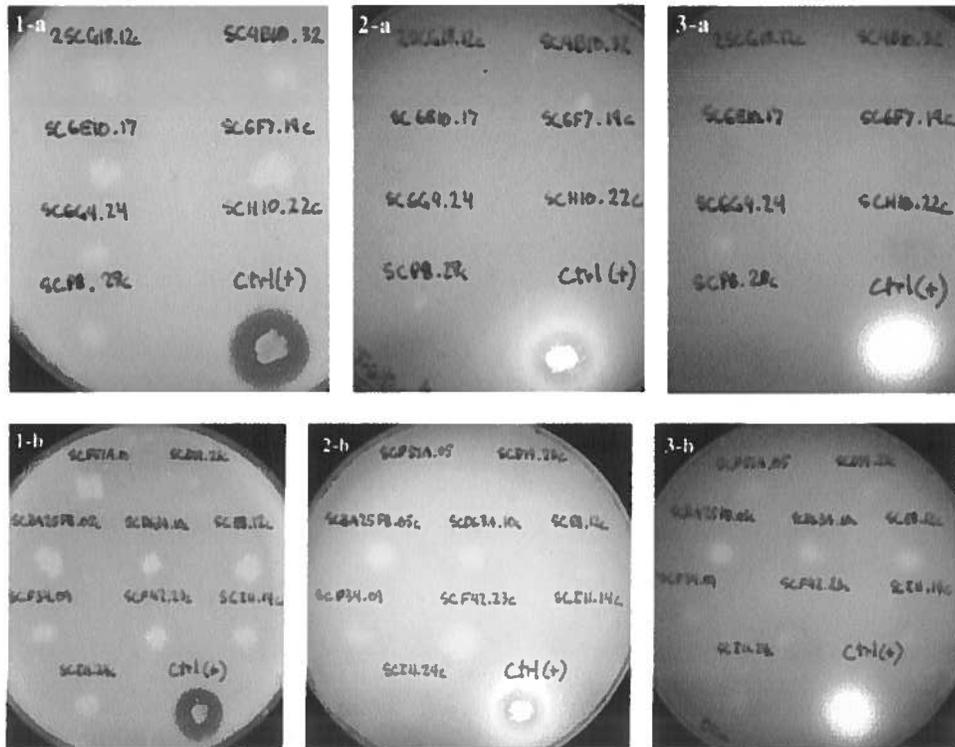
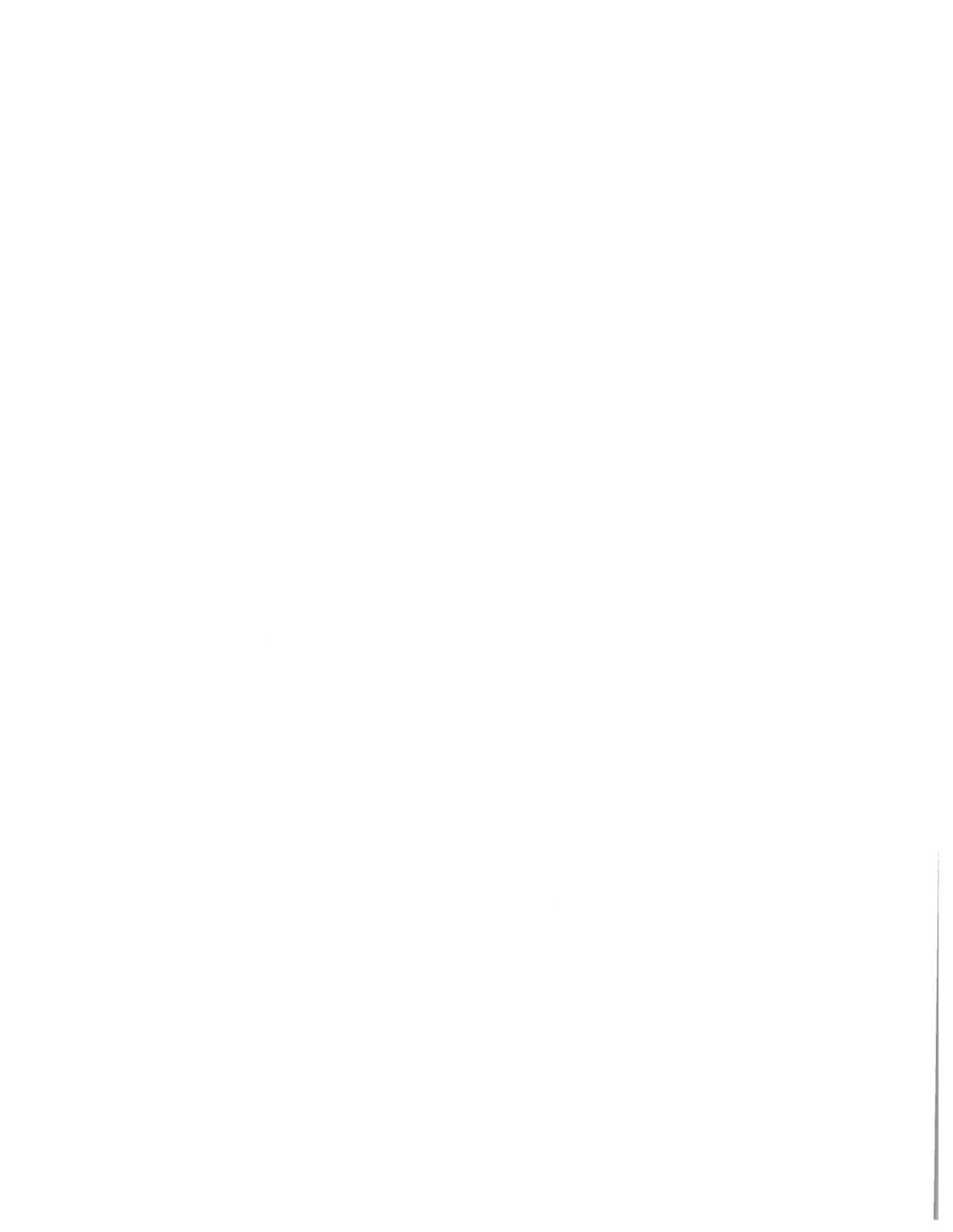


Figure A1. Zymogrammes des souches recombinantes exprimant les gènes de lipases/estérases de *S. coelicolor*. Gélose tributyrine (1-a,b), trioctanoate (2-a,b) et huile d'olive (3-a,b). Les milieux 2xTY ont été préparés tel que rapporté précédemment ([220]) avec les modifications suivantes : les géloses contenaient 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbénicilline et 0.5 mM d'IPTG. Les souches ont été induites 16h à 37°C. Les plages d'hydrolyse et les halos clairs dénotent la présence d'enzymes lipolytiques actives.



Annexe III

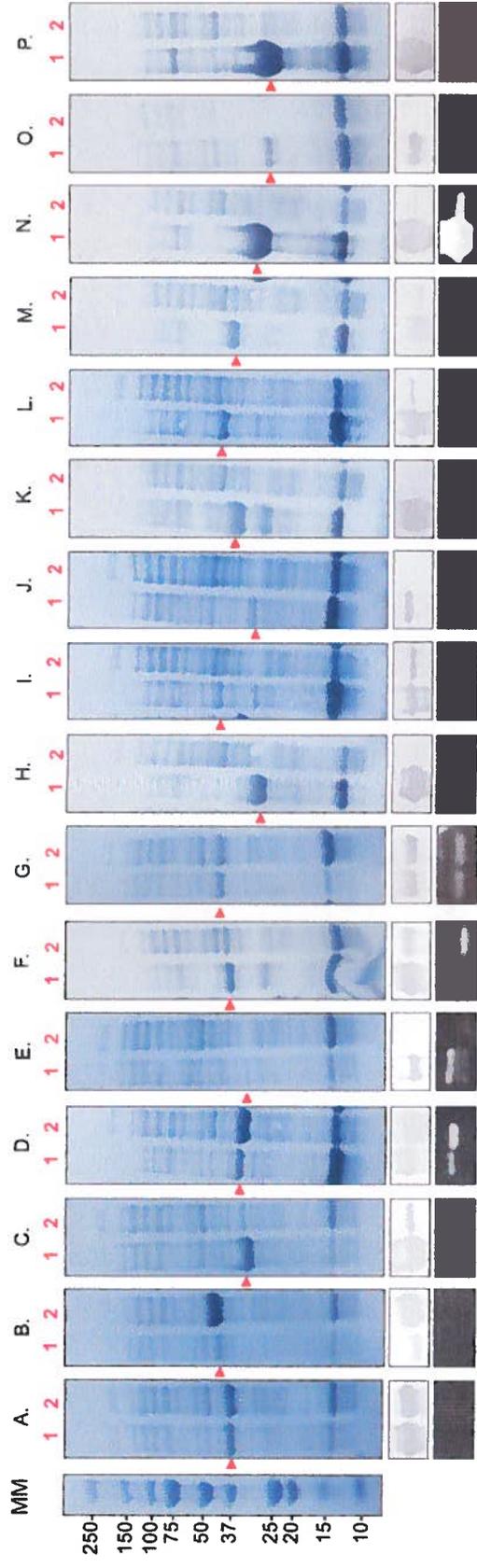
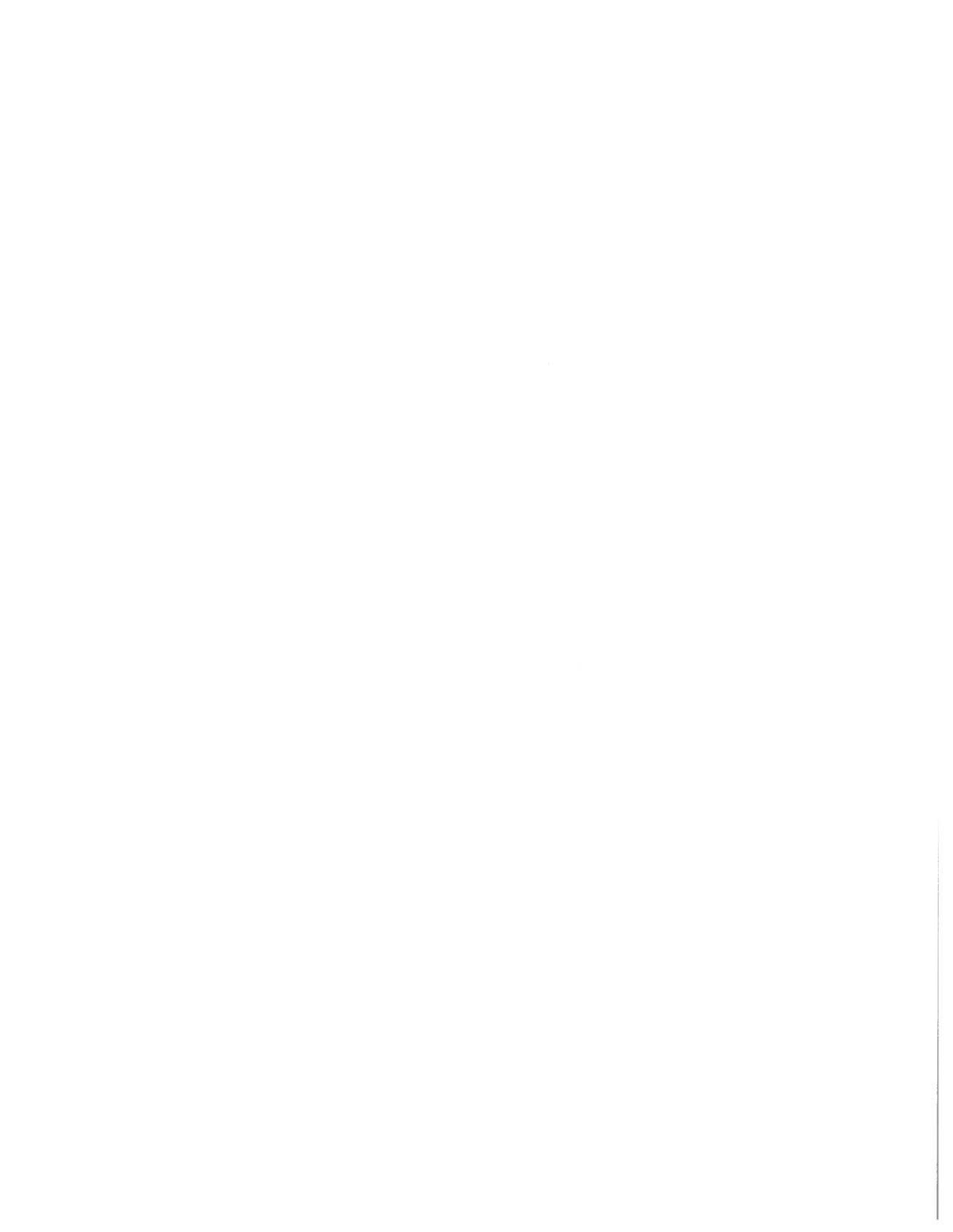


Figure A2. Gels SDS-PAGE, immunobuvardages et zymogrammes des lipases/estérases présomptives de *S. coelicolor* produites chez *E. coli* BL21(DE3). Les immunobuvardages correspondent aux encadrés à fonds blancs situés sous les images de gels SDS-PAGE et les zymogrammes correspondent aux encadrés à fonds noirs. MM. Marqueur de poids moléculaire en kDa, A. SC2G18.12c., B. SC4B10.32, C. SC6E10.17, D. SC6G4.24, F. SCH10.32c, G. SCP8.28c., H. SCF51.05, I. SCD19.23c, J. SCBAC25F8.05c, K. SCD63.10c, L. SCE8.12c, M. SCF34.09, N. SCF42.23c., O. SC11.14c, P. SC11.24c, 1) Fraction insoluble, 2) Fraction soluble. Les zymogrammes et immunobuvardages ont été préparés tel que décrit précédemment [269].



Annexe IV

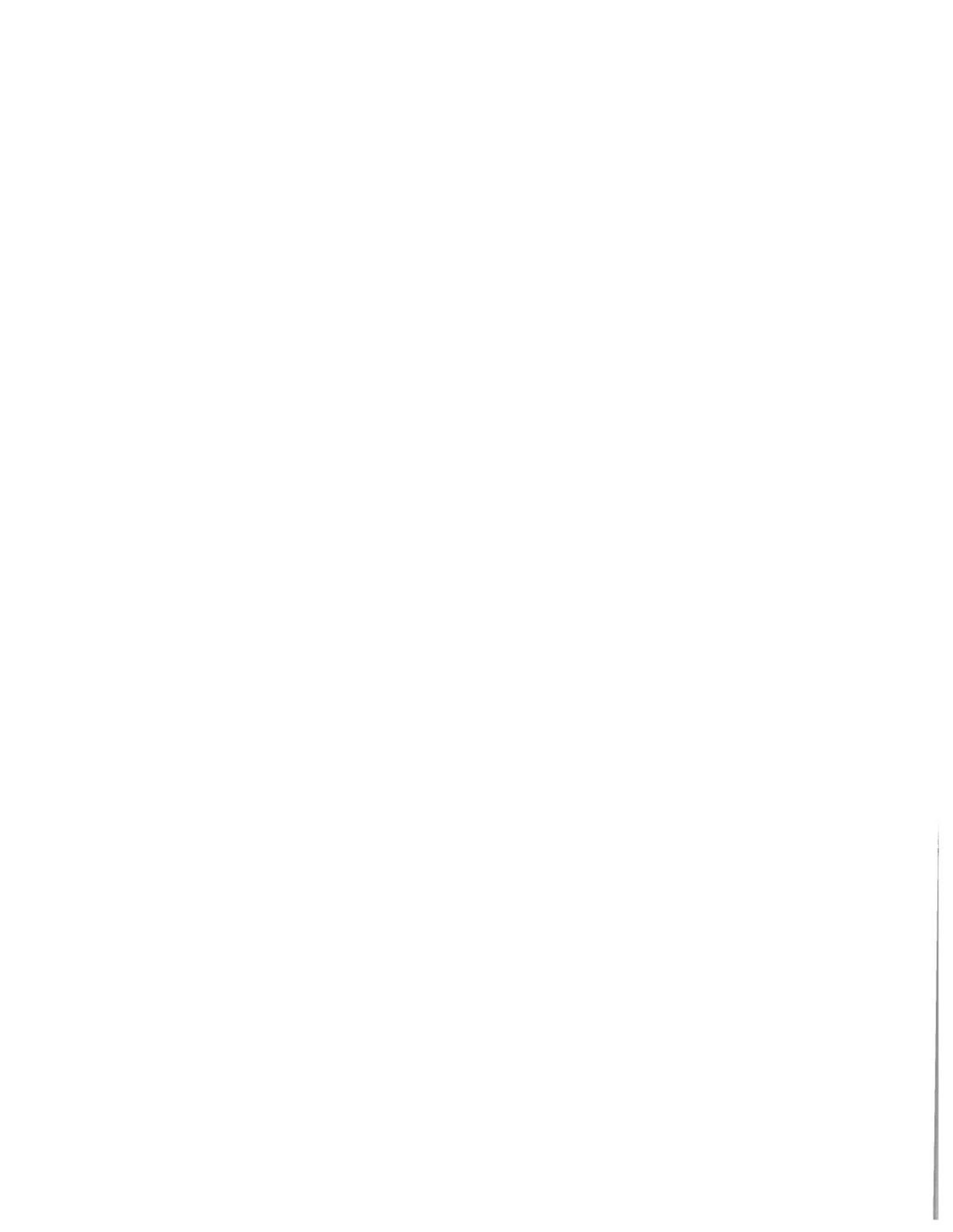
Tableau A2. Gènes lipolytiques provenant d'une librairie métagénomique enrichie.

Nom	Identification (GI)	Accession	Masse moléculaire (Da) ⁽¹⁾	Peptide signal de sécrétion ⁽²⁾	Ponts disulfures ⁽³⁾	Référence
LipIAF1-6	298362844	HM049169	30114	Résidus [1 à 27] : (Eucaryote ; 0.599) (Gram- ; 0.901) (Gram+ ; 0.590)	Non	[162]
LipIAF1-1	n/d	n/d	55458	Résidus [1 à 28], (Eucaryotes; 0.450) Résidus [1 à 24], (Gram -; 0.570) Résidus [1 à 12], (Gram+; 0.450)	Non	
LipF5-11	312860324	ADR10200	22498	Résidus [1 à 26] : (Eucaryote; 0.634) (Gram-; 0.570) (Gram+; 0.712)	Non	[147]
LipF1-14	n/d	n/d	19691	Résidus [1 à 26] : (Eucaryote; 0.814) (Gram-; 0.852) (Gram+; 0.597)	Non	
LipIAF5-2	186914885	ACC95208	32585	Résidus [1 à 27] : (Eucaryote; 0.836) (Gram-; 0.943) (Gram+; 0.888)	Non	[160]

(1) Masse moléculaire déterminée par traduction de la séquence génomique *via* le serveur ExPASy (www.expasy.org).

(2) Sites de clivages obtenus par analyse des séquences primaires avec le serveur Signal P v4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Le pointage de détermination (D-score) pour chaque groupe est entre parenthèses

(3) Prédiction de la présence de ponts disulfures *via* le serveur DISULFIND (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>).



Annexe V

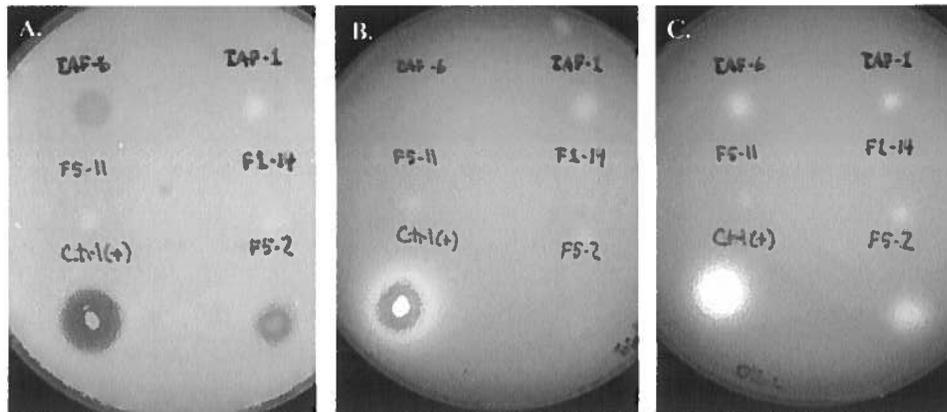


Figure A3. Zymogrammes des souches recombinantes exprimant les gènes de lipases/estérases issus d'une étude métagénomique. Gélose tributyrine (A), trioléine (B) et huile d'olive (C). Les milieux 2xTY Les milieux 2xTY ont été préparés tel que rapporté précédemment ([220]) avec les modifications suivantes : les géloses contenaient 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbénicilline et 0.5 mM d'IPTG. Les souches ont été induites 16h à 37°C. Les plages d'hydrolyse et les halos clairs dénotent la présence d'enzymes lipolytiques actives.

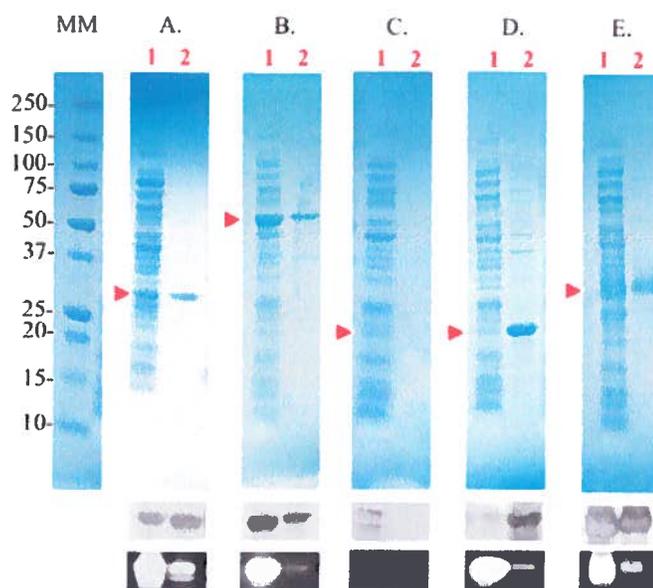


Figure A4. Gels SDS-PAGE, immunobuvardages et zymogrammes des lipases issues d'une étude métagénomique et produites chez *E. coli* BL21 (DE3). Les immunobuvardages correspondent aux encadrés à fonds blancs situés sous les images de gels SDS-PAGE et les zymogrammes correspondent aux encadrés à fonds noirs. MM. Marqueur de poids moléculaire en kDa, A. LipIAF1-6, B. LipIAF1-1, C. LipF1-14, D. LipF5-11, E. LipF5-2, 1) Fraction cytoplasmique soluble. 2) Fraction cytoplasmique insoluble. Les zymogrammes et immunobuvardages ont été préparés tel que décrit précédemment [269].

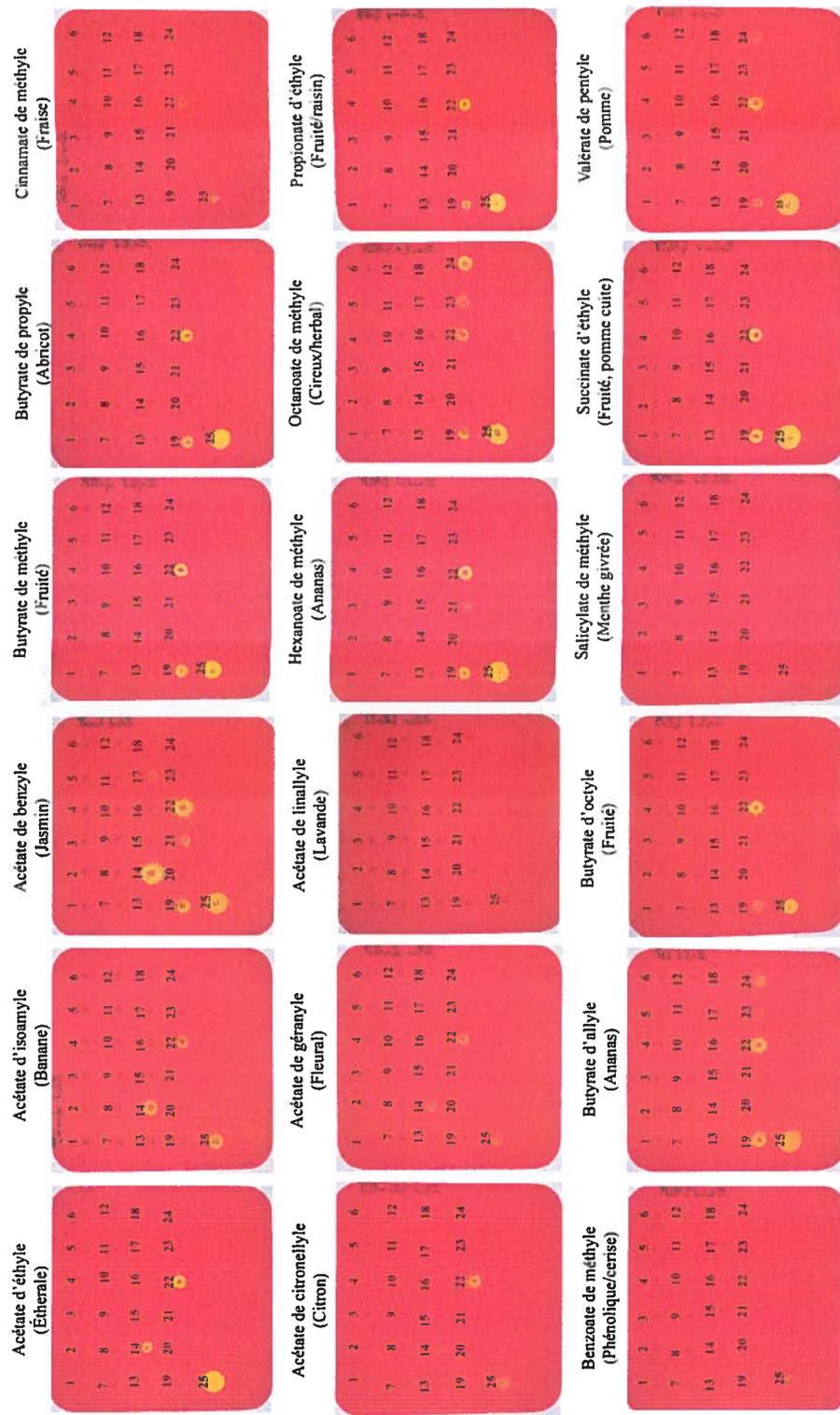


Figure A5. Zymogrammes d'hydrolyse d'esters à chaînes courtes employés comme arômes et fragrances. Les propriétés organoleptiques sont entre parenthèses. 1. Contrôle tampon de lyse, 2. Contrôle pET16b, 3. SCD19.23c, 4. SCE8.12c, 5. SC11.24c, 6. SCF42.23c, 7. SC11.14c, 8. SCBAC25F8.05, 9. SCD63A.10c, 10. SCF34.09, 11. SC6F7.19c, 12. SCP8.28c, 13. SC6G4.24, 14. SC4B10.32, 15. 2SCG18.12c, 16. SC6E10.17, 17. SCH10.22c, 18. LipIAF1-1, 19. LipIAF1-6, 20. LipF1-14,

21. LipF5-11, 22. LipIAF5-2, 23. Contrôle lipase RML (*E. coli*) 24. Contrôle RML mutée (*E. coli*) ([270]), 25. Contrôle CALB à 1 mg/mL (Sigma-Aldrich L3170). Les souches *E. coli* ont été cultivées en milieu LB liquide jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0.5-0.6 avant d'être induites avec 0.1 mM d'IPTG à 15°C pendant 24h. Les cellules ont ensuite été lysées avec la solution BugBuster (EMD Millipore) selon les instructions du fabricant. Dix microlitres des surnageants de lyse contenant les protéines cytoplasmiques solubles ont été déposés dans chacun des puits. Les gélases contiennent une émulsion d'agarose 0.7% (p/v) dans un tampon Tris-HCl 5 mM pH 8.0 contenant 2% (p/v) de gomme arabique et 10 mM de chaque ester comme substrat. Du rouge de phénol à raison de 0.5 mM a été employé comme indicateur de pH. Les gélases ont été incubées 15, 30, 60 et 180 minutes à 37°C. Les photos présentent correspondent à l'activité observée après 60 minutes. L'incubation à 180 minutes n'a pas démontré de changements significatifs des zones d'hydrolyse (résultats non-présentés). Un coloration jaune dénote une hydrolyse des substrats due à une activité lyolitique.

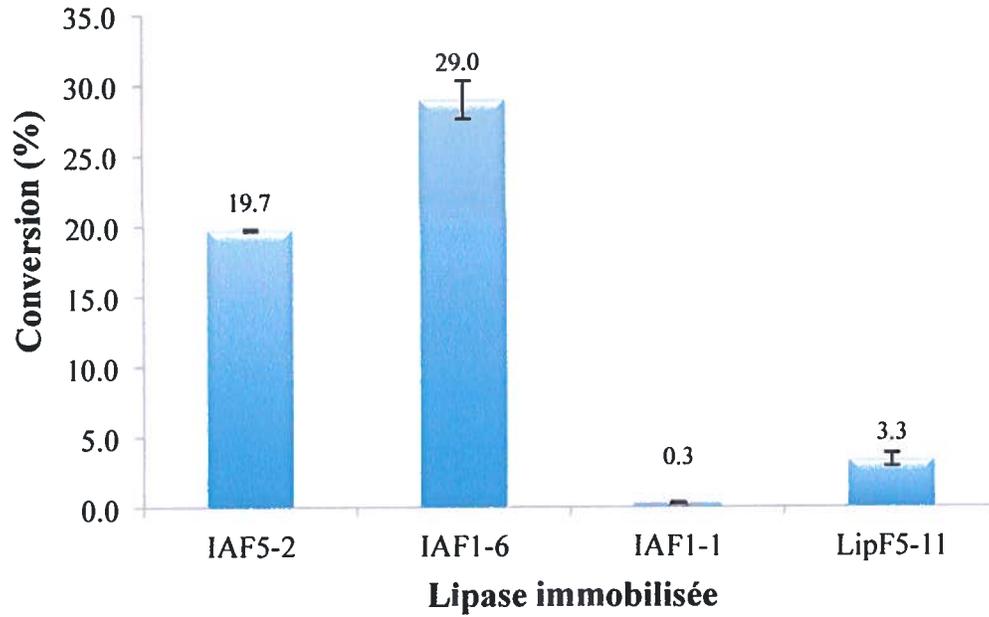
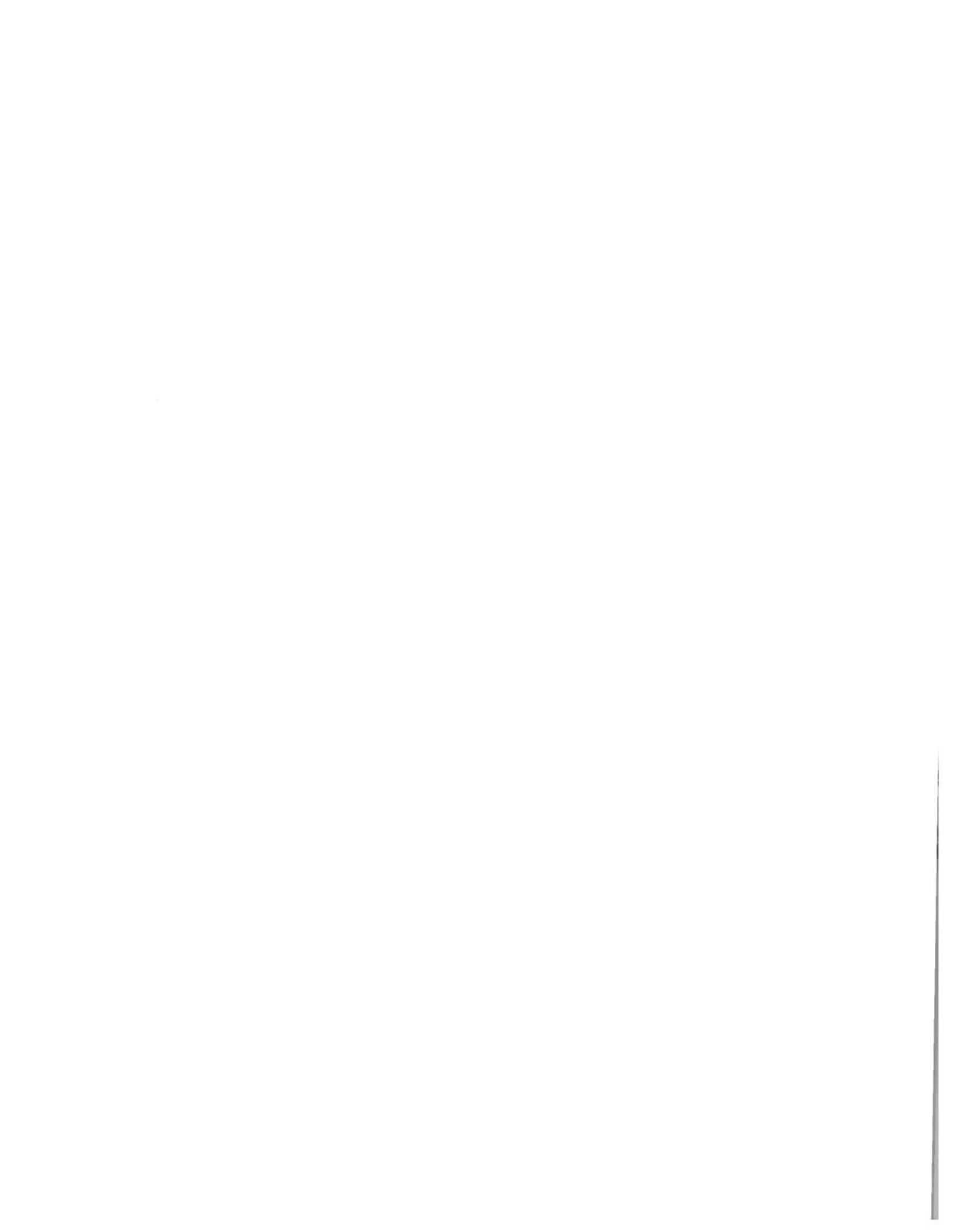


Figure A6. Comparaison de différents biocatalyseurs en cellules entières pour la synthèse de butyrate de méthyle par transestérification. Les cellules ont été perméabilisées au CTAB avant d'être lyophilisées. Les biocatalyseurs ont été préparés selon la méthode décrite précédemment [271].



Annexe VI

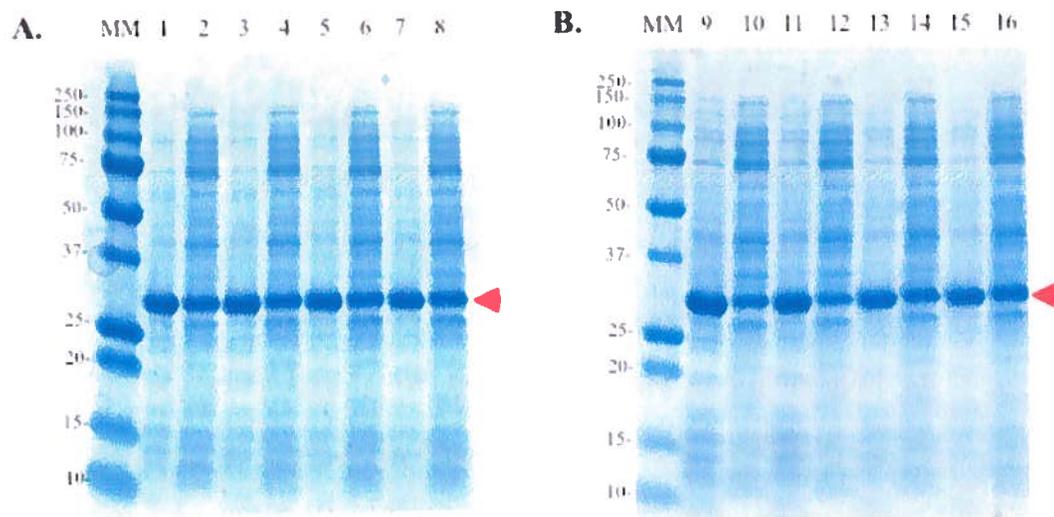


Figure A7. Effet du milieu de culture sur l'expression recombinante de LipIAF5-2. A. Milieux riches LB-Lennox et LB-Miller. 1 et 3, fractions insolubles milieu LB-Lennox. 2 et 4, fractions cytoplasmiques solubles milieu LB-Lennox. 5 et 7, fractions insolubles milieu LB-Miller. 6 et 8, fractions cytoplasmiques solubles milieu LB-Miller. B. Milieux minimaux M9-glucose (0.4% p/v) et M9-glycerol (2% p/v). 9 et 11, fractions insolubles milieu M9-glucose. 10 et 12, fractions cytoplasmiques solubles milieu M9-glucose. 13 et 15, fractions insolubles milieu M9-glycerol. 14 et 16, fractions cytoplasmiques solubles milieu M9-glycerol. Tous les échantillons ont été normalisés à une densité optique à 600 nm de 1.020 ± 0.010 avant d'être lysés au Bugbuster (EMD Millipore) selon les instructions du fabricant. Les résultats présentés correspondent à deux expériences indépendantes. La flèche rouge indique la bande correspondant à la lipase LipIAF5-2.

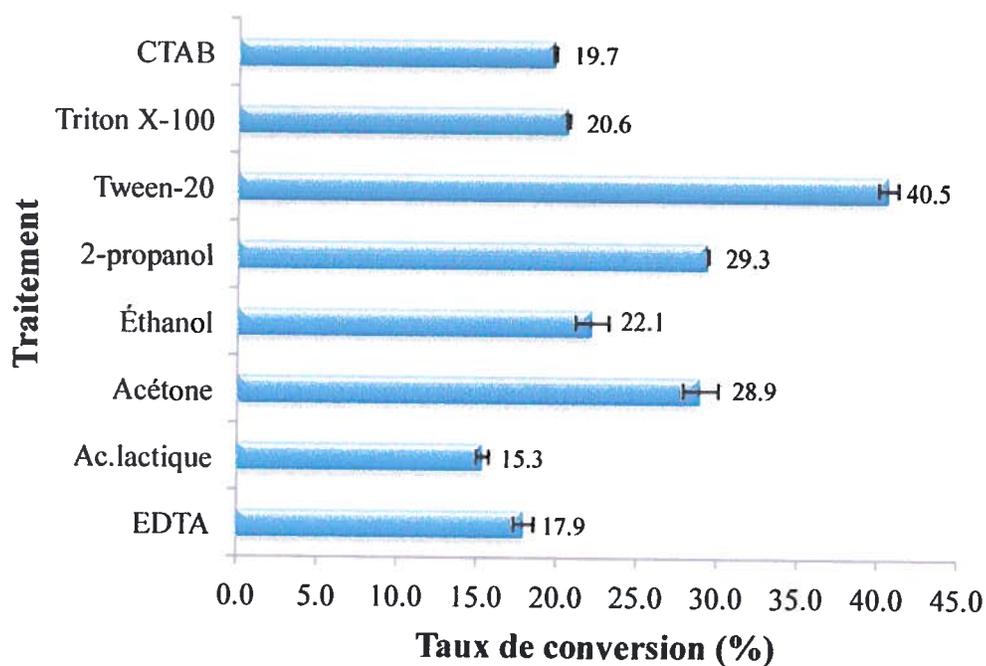


Figure A8. Effets d'agents perméabilisant sur la conversion du glycéryle tributyrate en butyrate de méthyle par LipIAF5-2 immobilisée en cellules entières. Les taux de conversion obtenus après 180 minutes de réaction sont exprimés par rapport au taux maximal théorique obtenu par la transestérification complète de 1 mmole de substrat. Les cellules ont été traitées selon les conditions optimales décrites précédemment [113].

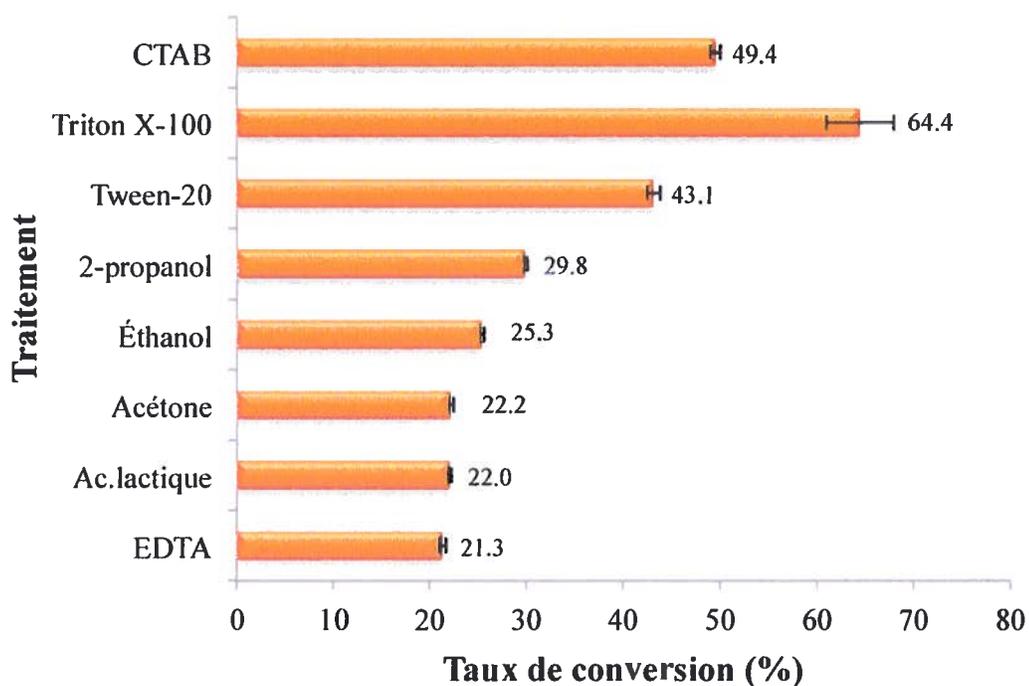
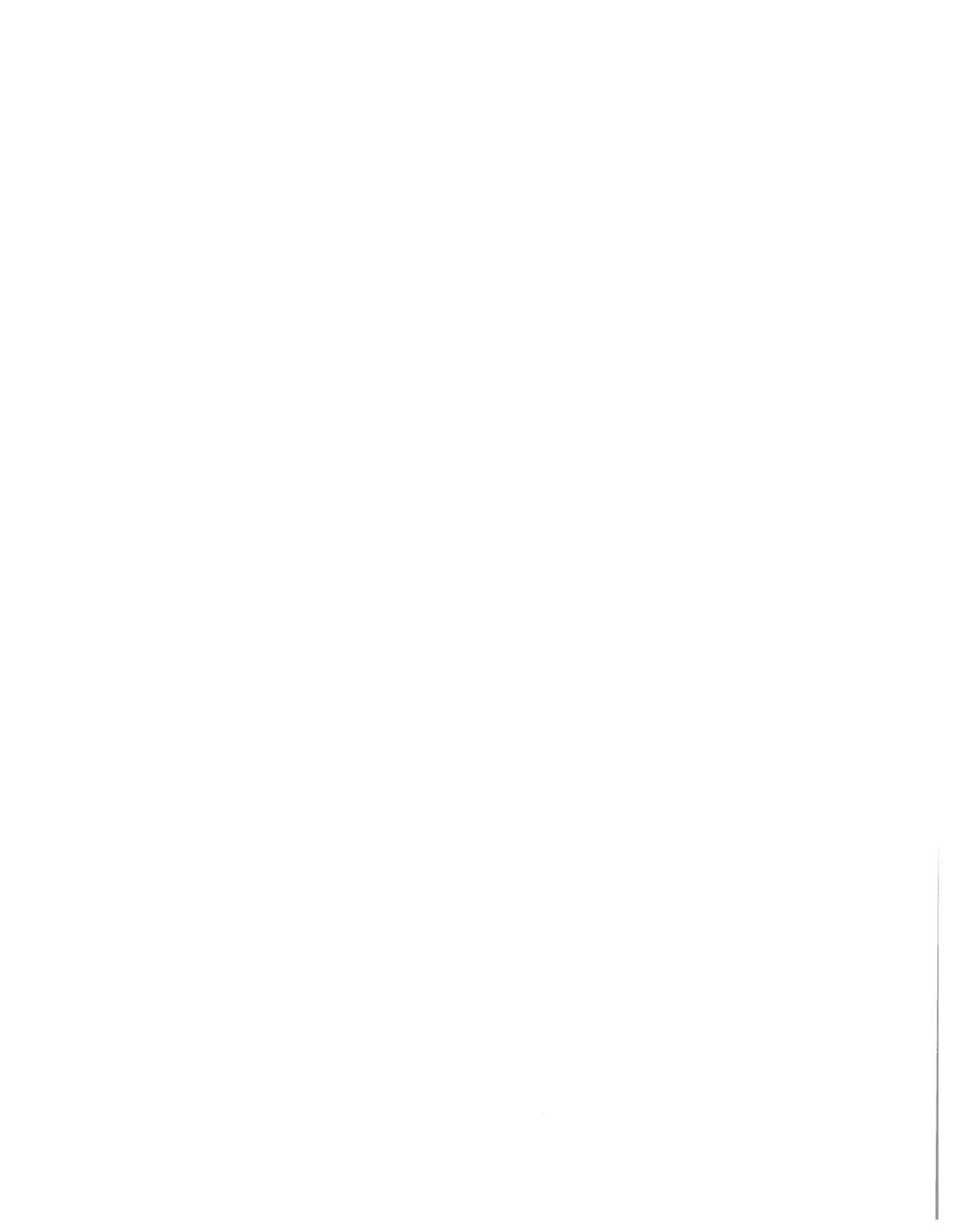
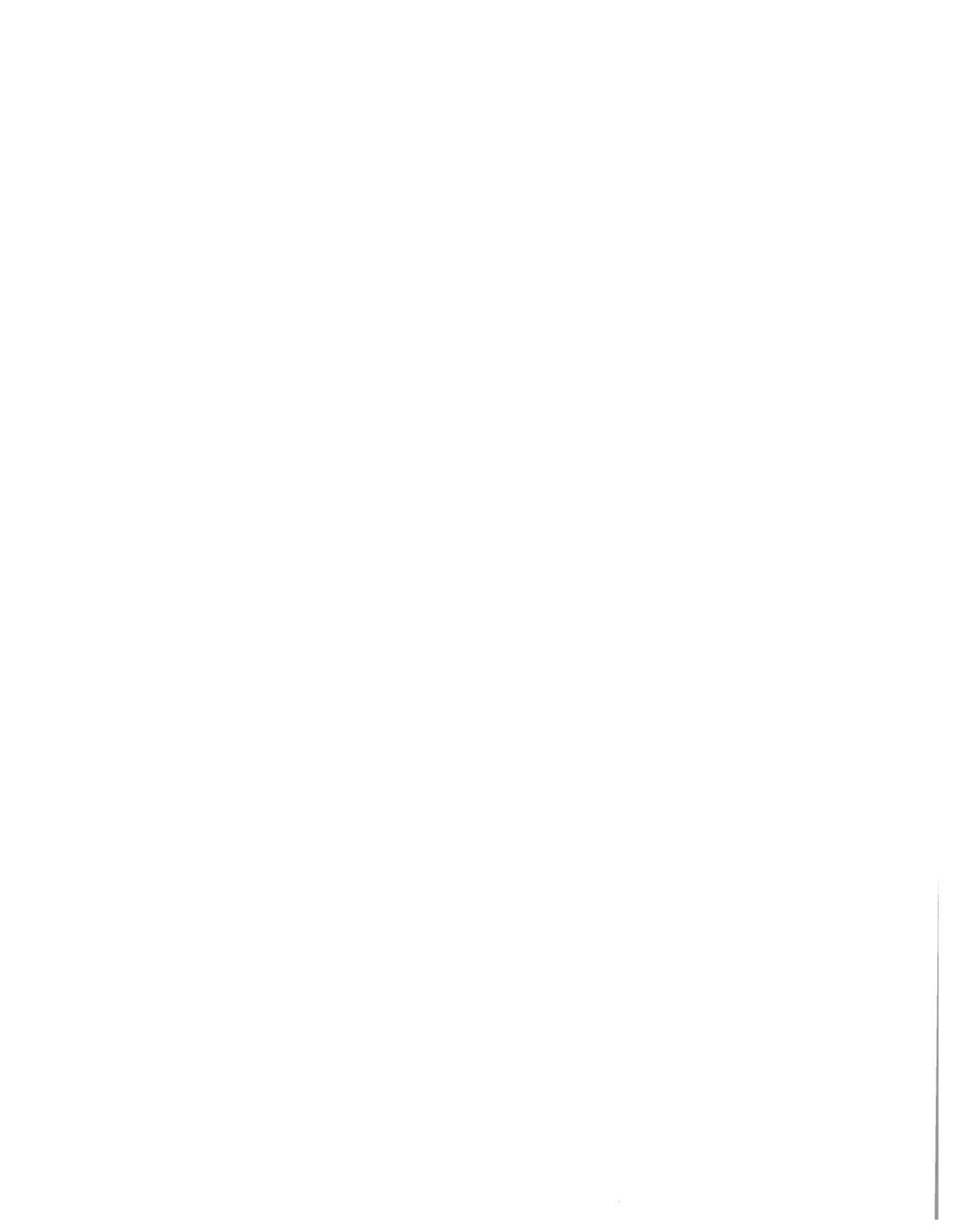


Figure A9. Effets d'agents perméabilisant sur la conversion du glycéryle tributyrate en butyrate de méthyle par LipIAF1-6 immobilisée en cellules entières. Les taux de conversion obtenus après 180 minutes de réaction sont exprimés par rapport au taux maximal théorique obtenu par la transestérification complète de 1 mmole de substrat. Les cellules ont été traitées selon les conditions optimales décrites précédemment [113].



Bibliographie



1. Srivastava S, Modak, J & Madras, G (2002) Enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. *Ind Eng Chem Res* **41**:1940-1945.
2. Kaufman VR & Garti, N (1982) Organic reactions in emulsions - Preparation of glycerol and polyglycerol esters of fatty acids by transesterification reaction. *J Am Oil Chem Soc* **59**(11):471-474.
3. Holmberg K (2001) Natural surfactants. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **6**(2):148-159.
4. Gu Y & Jerome, F (2013) Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chem Soc Rev* **42**(24):9550-9570.
5. Laudani CG, Habulin, M, Primožic, M, Knez, Z, Della Porta, G & Reverchon, E (2006) Optimisation of *n*-octyl oleate enzymatic synthesis over *Rhizomucor miehei* lipase. *Bioprocess Biosyst Eng* **29**:119-127.
6. Meher LC, Sagar, DV & Naik, SN (2006) Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. *Renew Sust Energ Rev* **10**(3):248-268.
7. Rottig A, Wenning, L, Broker, D & Steinbuchel, A (2010) Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**(6):1713-1733.
8. Pang K, Kotek, R & Tonelli, A (2006) Review of conventional and novel polymerization processes for polyesters. *Prog Polym Sci* **31**:1009-1037.
9. Gandhi NN (1997) Applications of lipase. *J Am Oil Chem Soc* **74**(6):621-634.
10. Canakci M & Sanli, H (2008) Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**(5):431-441.
11. Fukuda H, Kondo, A & Noda, H (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* **92**(5):405-416.
12. Haas MJ, McAloon, AJ, Yee, WC & Foglia, TA (2006) A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresour Technol* **97**(4):671-678.
13. Vasudevan PT & Briggs, M (2008) Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**(5):421-430.
14. Parawira W (2009) Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. *Crit Rev Biotechnol* **29**(2):82-93.

15. Antolin G, Tinaut, FV, Briceno, Y, Castano, V, Perez, C & Ramirez, AI (2002) Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresour Technol* **83**(2):111-114.
16. Lam MK, Lee, KT & Mohamed, AR (2010) Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. *Biotechnol Adv* **28**(4):500-518.
17. Ranganathan SV, Narasimhan, SL & Muthukumar, K (2008) An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresour Technol* **99**(10):3975-3981.
18. Zhang Y, Dube, MA, McLean, DD & Kates, M (2003) Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresour Technol* **90**(3):229-240.
19. Hama S & Kondo, A (2013) Enzymatic biodiesel production: an overview of potential feedstocks and process development. *Bioresour Technol* **135**:386-395.
20. Gray KA, Zhao, L & Emptage, M (2006) Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol* **10**(2):141-146.
21. Suehara K, Kawamoto, Y, Fujii, E, Kohda, J, Nakano, Y & Yano, T (2005) Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. *J Biosci Bioeng* **100**(4):437-442.
22. Demirbas A (2007) Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy* **35**(9):4661-4670.
23. Lotero E, Liu, Y, Lopez, DE, Suwannakarn, K, Bruce, DA & Goodwin Jr., JG (2005) Synthesis of biodiesel via acid catalysis. *Ind Eng Chem Res* **44**:5353-5363.
24. Clark JH, Luque, R & Matharu, AS (2012) Green chemistry, biofuels, and biorefinery. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **3**:183-207.
25. Kataoka N, Vangnai, AS, Tajima, T, Nakashimada, Y & Kato, J (2013) Improvement of (R)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* **115**(5):475-480.
26. Bornscheuer UT, Huisman, GW, Kazlauskas, RJ, Lutz, S, Moore, JC & Robins, K (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**(7397):185-194.
27. Prakash D, Nawani, N, Prakash, M, Bodas, M, Mandal, A, Khetmalas, M & Kapadnis, B (2013) Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *Biomed Res Int* **2013**:264020.

28. Narwal SK & Gupta, R (2013) Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. *Biotechnol Lett* **35**(4):479-490.
29. Fjerbaek L, Christensen, KV & Norddahl, B (2009) A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng* **102**(5):1298-1315.
30. Jaeger KE, Dijkstra, BW & Reetz, MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**:315-351.
31. Fojan P, Jonson, PH, Petersen, MT & Petersen, SB (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* **82**(11):1033-1041.
32. Zaks A & Klivanov, AM (1988) The effect of water on enzyme action in organic media. *J Biol Chem* **263**(17):8017-8021.
33. Wehtje E & Adlercreutz, P (1997) Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnol Bioeng* **55**(5):798-806.
34. Watanabe Y, Pinsirodom, P, Nagao, T, Kobayashi, T, Nishida, Y, Tkagi, Y & Shimada, Y (2005) Production of FAME from acid oil model using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem Soc* **82**(11):825-831.
35. Rehm S, Trodler, P & Pleiss, J (2010) Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. *Protein Sci* **19**(11):2122-2130.
36. Ollis DL, Cheah, E, Cygler, M, Dijkstra, B, Frolow, F, Franken, SM, Harel, M, Remington, SJ, Silman, I, Schrag, J & et al. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**(3):197-211.
37. Akoh CC, Lee, GC, Liaw, YC, Huang, TH & Shaw, JF (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* **43**(6):534-552.
38. Nagarajan S (2012) New tools for exploring "old friends-microbial lipases". *Appl Biochem Biotechnol* **168**(5):1163-1196.
39. Lotti M & Alberghina, L (2007) Lipases: Molecular Structure and Function. *Industrial enzymes -structure, fonction and applications*, Julio Polaina & Maccabe, AP (Édit.) Springer, Dordrecht, Netherlands. p 263-282.
40. Pleiss J, Fischer, M & Schmid, RD (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem Phys Lipids* **93**(1-2):67-80.
41. Kang HY, Kim, JF, Kim, MH, Park, SH, Oh, TK & Hur, CG (2006) MELDB: a database for microbial esterases and lipases. *FEBS Lett* **580**(11):2736-2740.

42. Messaoudi A, Belguith, H, Ghram, I & Hamida, JB (2011) LIPABASE: a database for 'true' lipase family enzymes. *Int J Bioinform Res Appl* **7**(4):390-401.
43. Widmann M, Juhl, PB & Pleiss, J (2010) Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. *BMC Genomics* **11**:123.
44. Kulschewski T, Sasso, F, Secundo, F, Lotti, M & Pleiss, J (2013) Molecular mechanism of deactivation of *C. antarctica* lipase B by methanol. *J Biotechnol* **168**(4):462-469.
45. Bousquet-Dubouch MP, Graber, M, Sousa, N, Lamare, S & Legoy, MD (2001) Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochim Biophys Acta* **1550**(1):90-99.
46. Paiva AL, Balcao, VM & Malcata, FX (2000) Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* **27**(3-5):187-204.
47. Du W, Xu, YY, Liu, DH & Li, ZB (2005) Study on acyl migration in immobilized Lipozym TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *J Mol Cat B Enz* **37**:68-71.
48. Turkan A & Kalay, S (2006) Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: elucidation of the mechanisms of lipases. *J Chromatogr A* **1127**(1-2):34-44.
49. Gupta R, Gupta, N & Rathi, P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(6):763-781.
50. Sharma R, Christi, Y & Banerjee, UC (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol Adv* **19**:627-662.
51. Papaleo E & Invernizzi, G (2011) Conformational plasticity of the calcium-binding pocket in the Burkholderia glumae lipase: remodeling induced by mutation of calcium coordinating residues. *Biopolymers* **95**(2):117-126.
52. Meier R, Drepper, T, Svensson, V, Jaeger, KE & Baumann, U (2007) A calcium-gated lid and a large beta-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *J Biol Chem* **282**(43):31477-31483.
53. Angkawidjaja C, You, DJ, Matsumura, H, Kuwahara, K, Koga, Y, Takano, K & Kanaya, S (2007) Crystal structure of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38 in a closed conformation. *FEBS Lett* **581**(26):5060-5064.

54. Rodrigues RC & Fernandez-Lafuente, R (2010) Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *J Mol Cat B Enz* **66**:15-32.
55. Jegannathan KR, Abang, S, Poncelet, D, Chan, ES & Ravindra, P (2008) Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. *Crit Rev Biotechnol* **28**(4):253-264.
56. Ma L, Persson, M & Adlercreutz, P (2002) Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enzyme Microb Technol* **31**(7):1024-1029.
57. Goldberg M, Thomas, D & Legoy, MD (1990) The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates. Effects of substrate polarity, water activity and water molecules on enzyme activity. *Eur J Biochem* **190**(3):603-609.
58. Li W, Du, W, Liu, D & Yao, Y (2008) Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and *tert*-butanol system. *Biochem Eng J* **41**:111-115.
59. Bornscheuer UT, Bessler, C, Srinivas, R & Krishna, SH (2002) Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol* **20**(10):433-437.
60. Majumder AB, Singh, B, Dutta, D, Sadhukhan, S & Gupta, MN (2006) Lipase catalyzed synthesis of benzyl acetate in solvent-free medium using vinyl acetate as acyl donor. *Bioorg Med Chem Lett* **16**(15):4041-4044.
61. Chica RA, Doucet, N & Pelletier, JN (2005) Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr Opin Biotechnol* **16**(4):378-384.
62. Turki S (2013) Towards the development of systems for high-yield production of microbial lipases. *Biotechnol Lett* **35**(10):1551-1560.
63. Chen JW & Wu, WT (2003) Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *J Biosci Bioeng* **95**(5):466-469.
64. Santambrogio C, Sasso, F, Natalello, A, Brocca, S, Grandori, R, Doglia, SM & Lotti, M (2013) Effects of methanol on a methanol-tolerant bacterial lipase. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(19):8609-8618.
65. Shimada Y, Watanabe, Y, Sugihara, A & Tominaga, Y (2002) Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J Mol Cat B Enz* **17**:133-142.

66. Whangsuk W, Sungkeeree, P, Thiengmag, S, Kerdwong, J, Sallabhan, R, Mongkolsuk, S & Loprasert, S (2013) Gene cloning and characterization of a novel highly organic solvent tolerant lipase from *Proteus* sp. SW1 and its application for biodiesel production. *Mol Biotechnol* **53**(1):55-62.
67. Nouredini H, Gao, X & Philkana, RS (2005) Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour Technol* **96**(7):769-777.
68. Yang J, Guo, D & Yan, Y (2007) Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *J Mol Cat B Enz* **45**:91-96.
69. Chaubey A, Parshad, R, Koul, S, Taneja, SC & Qazi, GN (2006) *Arthrobacter* sp. lipase immobilization for improvement in stability and enantioselectivity. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**(3):598-606.
70. Hanefeld U, Gardossi, L & Magner, E (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* **38**(2):453-468.
71. Soares CM, de Castro, HF, Itako, JE, de Moraes, FF & Zanin, GM (2005) Characterization of sol-gel bioencapsulates for ester hydrolysis and synthesis. *Appl Biochem Biotechnol* **121-124**:845-859.
72. Robles-Medina A, Gonzalez-Moreno, PA, Esteban-Cerdan, L & Molina-Grima, E (2009) Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol Adv* **27**(4):398-408.
73. Jaeger KE & Eggert, T (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**(4):390-397.
74. Du W, Li, W, Sun, T, Chen, X & Liu, D (2008) Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**(3):331-337.
75. Park EY, Sato, M & Kojima, S (2006) Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. *Enzyme Microb Technol* **39**:889-896.
76. Nielsen PM, Brask, J & Fjerbaek, L (2008) Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. *Eur J Lipid Sci Technol* **110**(8):692-700.
77. Singh RK, Tiwari, MK, Singh, R & Lee, JK (2013) From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int J Mol Sci* **14**(1):1232-1277.

78. Hsu AF, Jones, KC, Foglia, TA & Marmer, WN (2003) Optimization of alkyl ester production from grease using a phyllosilicate sol-gel immobilized lipase. *Biotechnol Lett* **25**(20):1713-1716.
79. Mateo C, Palomo, JM, Fernandez-Lorente, G, Guisan, JM & Fernandez-Lafuente, R (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* **40**:1451-1463.
80. Cervero JM, Alvarez, JR & Luque, S (2014) Novozym 435-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl esters from soybean oil for biodiesel production. *Biomass Bioenergy* **61**:131-137.
81. Jegannathan KR, Abang, S, Poncelet, D, Chan, ES & Ravindra, P (2008) Production of biodiesel using immobilized lipase-a critical review. *Crit Rev Biotechnol* **28**(4):253-264.
82. Soares CM, dos Santos, OA, de Castro, HF, de Moraes, FF & Zanin, GM (2004) Studies on immobilized lipase in hydrophobic sol-gel. *Appl Biochem Biotechnol* **113-116**:307-319.
83. Blanco RM, Terreros, P, Fernandez-Perez, M, Otero, C & Diaz-Gonzalez, G (2004) Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization. Characterization of the support and the catalysts. *J Mol Catal B Enzym* **30**:83-93.
84. Yadav GD & Jadhav, SR (2005) Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in non-aqueous medium. *Microporous Mesoporous Mater* **86**:215-222.
85. Chen B, Hu, J, Miller, EM, Xie, W, Cai, M & Gross, RA (2008) *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules* **9**:463-471.
86. Sheldon RA, Schoevaart, R & Van Langen, M (2005) Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal Biotransformation* **23**(3-4):141-147.
87. Cao L (2005) Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol* **9**(2):217-226.
88. Poppe JK, Costa, APO, Brasil, MC, Rodrigues, RC & Ayub, MAZ (2013) Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: characterization and application in transesterification reaction. *J Mol Catal B Enz* **94**:57-62.

89. Valdes EC, Soto, LW & Arcaya, GA (2011) Influence of the pH of glutaraldehyde and the use of dextran aldehyde on the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Burkholderia cepacia*. *Electron J Biotech* 14: (<http://ejbiotechnology.info>), 10.2225/vol14-issue3-fulltext-1.
90. Mateo C, Torres, R, Fernandez-Lorente, G, Ortiz, C, Fuentes, M, Hidalgo, A, Lopez-Gallego, F, Abian, O, Palomo, JM, Betancor, L, Pessela, BC, Guisan, JM & Fernandez-Lafuente, R (2003) Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* 4(3):772-777.
91. Barao CE, de Paris, LD, Dantas, JH, Pereira, MM, Filho, LC, de Castro, HF, Zanin, GM, de Moraes, FF & Soares, CM (2014) Characterization of biocatalysts prepared with *Thermomyces lanuginosus* lipase and different silica precursors dried using aerogel and xerogel techniques. *Appl Biochem Biotechnol* 172(1):263-274.
92. Rozga-Wijas K, Chojnowski, J, Scibiorek, M & Fortuniak, W (2005) Polysiloxane-silica hybrids from novel precursors by the sol-gel process. *J Mater Chem* 15:2383-2392.
93. Reetz MT, Zonta, A & Simpelkamp, J (1996) Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnol Bioeng* 49(5):527-534.
94. Hsu AF, Jones, KC, Foglia, TA & Marmer, WN (2004) Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. *Biotechnol Lett* 26(11):917-921.
95. de Souza RL, de Faria, EL, Figueiredo, RT, Freitas Ldos, S, Iglesias, M, Mattedi, S, Zanin, GM, dos Santos, OA, Coutinho, JA, Lima, AS & Soares, CM (2013) Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme Microb Technol* 52(3):141-150.
96. Hanefeld U, Gardossi, L & Magner, E (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* 38(2):453-468.
97. Macauley-Patrick S, Fazenda, ML, McNeil, B & Harvey, LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22(4):249-270.
98. Cereghino GP & Cregg, JM (1999) Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol* 10(5):422-427.
99. Schmidt FR (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:363-372.

100. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin, J, Corchero, JL, Vazquez, E & Villaverde, A (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact* **8**(17): 10.1186/1475-2859-8-17.
101. Sheldon RA, Schoevaart, R & Van Langen, LM (2005) Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation* **23**(3-4):141-147.
102. Leon R, Fernandes, P, Pinheiro, HM & Cabral, JMS (1998) Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enz Microb Technol* **24**:483-500.
103. Ishige T, Honda, K & Shimizu, S (2005) Whole organism biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* **9**(2):174-180.
104. Pscheidt B & Glieder, A (2008) Yeast cell factories for fine chemical and API production. *Microb Cell Fact* **7**:25.
105. Yan J, Li, A, Xu, Y, Ngo, TP, Phua, S & Li, Z (2012) Efficient production of biodiesel from waste grease: one-pot esterification and transesterification with tandem lipases. *Bioresour Technol* **123**:332-337.
106. Gao B, Su, E, Lin, J, Jiang, Z, Ma, Y & Wei, D (2009) Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus* sp. for biodiesel production. *J Biotechnol* **139**(2):169-175.
107. Li A, Ngo, TP, Yan, J, Tian, K & Li, Z (2012) Whole-cell based solvent-free system for one-pot production of biodiesel from waste grease. *Bioresour Technol* **114**:725-729.
108. Dib I, Stanzer, D & Nidetzky, B (2007) *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase: control of protein quality and opportunities for biocatalysis through production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **73**(1):331-333.
109. Zheng GW, Pan, J, Yu, HL, Ngo-Thi, MT, Li, CX & Xu, JH (2010) An efficient bioprocess for enzymatic production of L-menthol with high ratio of substrate to catalyst using whole cells of recombinant *E. coli*. *J Biotechnol* **150**(1):108-114.
110. Matsumoto T, Takahashi, S, Kaieda, M, Ueda, M, Tanaka, A, Fukuda, H & Kondo, A (2001) Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**(4):515-520.
111. Yan J, Zheng, X & Li, S (2013) A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces*

lanuginosus lipase: Preparation, characterization and application in biodiesel production. *Bioresour Technol* **151C**:43-48.

112. Hama S, Tamalampudi, S, Suzuki, Y, Yoshida, A, Fukuda, H & Kondo, A (2008) Preparation and comparative characterization of immobilized *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase for enzymatic biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**(4):637-645.
113. Canovas M, Torroglosa, T & Iborra, JL (2005) Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine. *Enzyme Microb Technol* **37**:300-308.
114. Li XF, Lu, ZH, Liu, HW, Zhao, GL, Wu, H, Yuan, K & Yu, YG (2012) Dependence of catalytic performance of a freeze-dried whole-cell biocatalyst of *Pseudomonas fluorescens* in regioselective acetylation of 1-B-D-arabinofuranosylcytosine on growth conditions. *Process Biochem* **47**:1826-1831.
115. Ban K, Kaieda, M, Matsumoto, T, Kondo, A & Fukuda, H (2001) Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem Eng J* **8**(1):39-43.
116. Hama S, Tamalampudi, S, Fukumizu, T, Miura, K, Yamaji, H, Kondo, A & Fukuda, H (2006) Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. *J Biosci Bioeng* **101**(4):328-333.
117. Hama S, Miura, K, Yoshida, A, Noda, H, Fukuda, H & Kondo, A (2011) Transesterification of phosphatidylcholine in *sn*-1 position through direct use of lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells as whole-cell biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**(5):1731-1738.
118. Ban K, Hama, S, Nishizuka, K, Kaieda, M, Matsumoto, T, Kondo, A, Noda, H & Fukuda, H (2002) Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *J Mol Catal B Enzym* **17**:157-165.
119. Hama S, Yamaji, H, Fukumizu, T, Numata, T, Tamalampudi, S, Kondo, A, Noda, H & Fukuda, H (2007) Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem Eng J* **34**:273-278.
120. Fukuda H, Hama, S, Tamalampudi, S & Noda, H (2008) Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol* **26**(12):668-673.

121. Wu CH, Mulchandani, A & Chen, W (2008) Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuels production. *Trends Microbiol* **16**(4):181-188.
122. Kondo A & Ueda, M (2004) Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(1):28-40.
123. Desvaux M, Dumas, E, Chafsey, I & Hebraud, M (2006) Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett* **256**(1):1-15.
124. Jose J & Meyer, TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(4):600-619.
125. Jung HC, Ko, S, Ju, SJ, Kim, EJ, Kim, MK & Pan, JG (2003) Bacterial cell surface display of lipase and its randomly mutated library facilitates high-throughput screening of mutants showing higher specific activities. *J Mol Catal B Enzym* **26**:177-184.
126. Lee SH, Choi, JI, Han, MJ, Choi, JH & Lee, SY (2005) Display of lipase on the cell surface of *Escherichia coli* using OprF as an anchor and its application to enantioselective resolution in organic solvent. *Biotechnol Bioeng* **90**(2):223-230.
127. Lee SH, Choi, JI, Park, SJ, Lee, SY & Park, BC (2004) Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis. *Appl Environ Microbiol* **70**(9):5074-5080.
128. Narita J, Okano, K, Tateno, T, Tanino, T, Sewaki, T, Sung, MH, Fukuda, H & Kondo, A (2006) Display of active enzymes on the cell surface of *Escherichia coli* using PgsA anchor protein and their application to bioconversion. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**(5):564-572.
129. Baek JH, Han, MJ, Lee, SH & Lee, SY (2010) Enhanced display of lipase on the *Escherichia coli* cell surface, based on transcriptome analysis. *Appl Environ Microbiol* **76**(3):971-973.
130. Becker S, Theile, S, Heppeler, N, Michalczyk, A, Wentzel, A, Wilhelm, S, Jaeger, KE & Kolmar, H (2005) A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett* **579**(5):1177-1182.
131. Jung HC, Kwon, SJ & Pan, JG (2006) Display of a thermostable lipase on the surface of a solvent-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* GM730, and its applications in whole-cell biocatalysis. *BMC Biotechnol* **6**:23.

132. Shibasaki S, Ueda, M, Iizuka, T, Hirayama, M, Ikeda, Y, Kamasawa, N, Osumi, M & Tanaka, A (2001) Quantitative evaluation of the enhanced green fluorescent protein displayed on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* by fluorometric and confocal laser scanning microscopic analyses. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**(4):471-475.
133. Tanino T, Aoki, T, Chung, WY, Watanabe, Y, Ogino, C, Fukuda, H & Kondo, A (2009) Improvement of a *Candida antarctica* lipase B-displaying yeast whole-cell biocatalyst and its application to the polyester synthesis reaction. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**(1):59-66.
134. Matsumoto T, Fukuda, H, Ueda, M, Tanaka, A & Kondo, A (2002) Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Appl Environ Microbiol* **68**(9):4517-4522.
135. Kato M, Fuchimoto, J, Tanino, T, Kondo, A, Fukuda, H & Ueda, M (2007) Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**(3):549-555.
136. Han SY, Pan, ZY, Huang, DF, Ueda, M, Wang, XN & Lin, Y (2009) Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. *J Mol Catal B Enzym* **59**:168-172.
137. Su GD, Huang, DF, Han, SY, Zheng, SP & Lin, Y (2010) Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**(5):1493-1501.
138. Hama S, Yoshida, A, Nakashima, K, Noda, H, Fukuda, H & Kondo, A (2010) Surfactant-modified yeast whole-cell biocatalyst displaying lipase on cell surface for enzymatic production of structured lipids in organic media. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**(2):537-543.
139. Eggert T, Leggewie, C, Puls, M, Streit, W, van Pouderooyen, G, Dijkstra, BW & Jaeger, KE (2004) Novel biocatalysts by identification and design. *Biocatal Biotransform* **22**(2):141-146.
140. Treichel H, de Oliveira, D, Mazutti, MA, Di Luccio, M & Oliveira, JV (2010) A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol* **3**:182-196.
141. Ikeda H, Shin-Ya, K & Omura, S (2013) Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous

expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 10.1007/s10295-013-1327-x: 10.1007/s10295-013-1327-x.

142. Soror SH, Verma, V, Rao, R, Rasool, S, Koul, S, Qazi, GN & Cullum, J (2007) A cold-active esterase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): from genome sequence to enzyme activity. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34(8):525-531.
143. Xiao Z, Boyd, J, Grosse, S, Beauchemin, M, Coupe, E & Lau, PCK (2008) Mining *Xanthomonas* and *Streptomyces* genomes for new pectinase-encoding sequences and their heterologous expression in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:973-981.
144. Handelsman J, Rondon, MR, Brady, SF, Clardy, J & Goodman, RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5(10):R245-249.
145. Riesenfeld CS, Schloss, PD & Handelsman, J (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 38:525-552.
146. Uchiyama T & Miyazaki, K (2009) Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr Opin Biotechnol* 20(6):616-622.
147. Lussier FX, Chambenoit, O, Côté, A, Hupé, JF, Denis, F, Juteau, P, Beaudet, R & Shareck, F (2011) Construction and functional screening of a metagenomic library using a T7 RNA polymerase-based expression cosmid vector. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38(9):1321-1328.
148. Lorenz P, Liebeton, K, Niehaus, F & Eck, J (2002) Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol* 13(6):572-577.
149. Daniel R (2005) The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol* 3(6):470-478.
150. Glogauer A, Martini, VP, Faoro, H, Couto, GH, Muller-Santos, M, Monteiro, RA, Mitchell, DA, de Souza, EM, Pedrosa, FO & Krieger, N (2011) Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microb Cell Fact* 10:54.
151. Adams MW & Kelly, RM (1998) Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends Biotechnol* 16(8):329-332.
152. Tirawongsaroj P, Sriprang, R, Harnpicharnchai, P, Thongaram, T, Champreda, V, Tanapongpipat, S, Pootanakit, K & Eurwilaichitr, L (2008) Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *J Biotechnol* 133(1):42-49.

153. Sharma PK, Singh, K, Singh, R, Capalash, N, Ali, A, Mohammad, O & Kaur, J (2012) Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. *Mol Biol Rep* **39**(3):2795-2804.
154. Fu J, Leiros, HK, de Pascale, D, Johnson, KA, Blencke, HM & Landfald, B (2013) Functional and structural studies of a novel cold-adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(9):3965-3978.
155. Roh C & Villatte, F (2008) Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. *J Appl Microbiol* **105**(1):116-123.
156. Joseph B, Ramteke, PW & Thomas, G (2008) Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv* **26**(5):457-470.
157. Knietsch A, Waschkowitz, T, Bowien, S, Henne, A & Daniel, R (2003) Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**(3):1408-1416.
158. Rees HC, Grant, S, Jones, B, Grant, WD & Heaphy, S (2003) Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles* **7**(5):415-421.
159. Gabor EM, de Vries, EJ & Janssen, DB (2004) Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ Microbiol* **6**(9):948-958.
160. Meilleur C, Hupé, JF, Juteau, P & Shareck, F (2009) Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**(6):853-861.
161. Chow J, Kovacic, F, Dall Antonia, Y, Krauss, U, Fersini, F, Schmeisser, C, Lauinger, B, Bongen, P, Pietruszka, J, Schmidt, M, Menyes, I, Bornscheuer, UT, Eckstein, M, Thum, O, Liese, A, Mueller-Dieckmann, J, Jaeger, KE & Streit, WR (2012) The metagenome-derived enzymes LipS and LipT increase the diversity of known lipases. *PLoS One* **7**(10):e47665.
162. Côté A & Shareck, F (2010) Expression and characterization of a novel heterologous moderately thermostable lipase derived from metagenomics in *Streptomyces lividans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**(9):883-891.
163. Lorenz P & Eck, J (2005) Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* **3**(6):510-516.

164. Roh C & Schmid, RD (2013) Isolation of an organic solvent-tolerant lipolytic enzyme from uncultivated microorganism. *Appl Biochem Biotechnol* **171**(7):1750-1758.
165. Khan M, Jithesh, K & Mookambikay, R (2013) Cloning and characterization of two functionally diverse lipases from soil metagenome. *J Gen Appl Microbiol* **59**(1):21-31.
166. Zheng J, Liu, C, Liu, L & Jin, Q (2013) Characterisation of a thermo-alkali-stable lipase from oil-contaminated soil using a metagenomic approach. *Syst Appl Microbiol* **36**(3):197-204.
167. Zheng J, Liu, L, Liu, C & Jin, Q (2012) Molecular cloning and heterologous expression of a true lipase in *Pichia pastoris* isolated via a metagenomic approach. *J Mol Microbiol Biotechnol* **22**(5):300-311.
168. Khan M & Jithesh, K (2012) Expression and purification of organic solvent stable lipase from soil metagenomic library. *World J Microbiol Biotechnol* **28**(6):2417-2424.
169. Lee MH, Oh, KH, Kang, CH, Kim, JH, Oh, TK, Ryu, CM & Yoon, JH (2012) Novel metagenome-derived, cold-adapted alkaline phospholipase with superior lipase activity as an intermediate between phospholipase and lipase. *Appl Environ Microbiol* **78**(14):4959-4966.
170. Selvin J, Kennedy, J, Lejon, DP, Kiran, GS & Dobson, AD (2012) Isolation identification and biochemical characterization of a novel halo-tolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*. *Microb Cell Fact* **11**:72.
171. Morohoshi T, Oikawa, M, Sato, S, Kikuchi, N, Kato, N & Ikeda, T (2011) Isolation and characterization of novel lipases from a metagenomic library of the microbial community in the pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes hybrida*. *J Biosci Bioeng* **112**(4):315-320.
172. Liu K, Wang, J, Bu, D, Zhao, S, McSweeney, C, Yu, P & Li, D (2009) Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. *Biochem Biophys Res Commun* **385**(4):605-611.
173. Shao H, Xu, L & Yan, Y (2013) Isolation and characterization of a thermostable esterase from a metagenomic library. *J Ind Microbiol Biotechnol* **40**(11):1211-1222.
174. Zhu Y, Li, J, Cai, H, Ni, H, Xiao, A & Hou, L (2013) Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. *Microbiol Res* **168**(9):589-597.

175. Berlemont R, Spee, O, Delsaute, M, Lara, Y, Schuldes, J, Simon, C, Power, P, Daniel, R & Galleni, M (2013) Novel organic solvent-tolerant esterase isolated by metagenomics: insights into the lipase/esterase classification. *Rev Argent Microbiol* **45**(1):3-12.
176. Jimenez DJ, Montana, JS, Alvarez, D & Baena, S (2012) A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. *World J Microbiol Biotechnol* **28**(1):361-370.
177. Fan X, Liu, X, Huang, R & Liu, Y (2012) Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach. *Microb Cell Fact* **11**:33.
178. Tao W, Lee, MH, Yoon, MY, Kim, JC, Malhotra, S, Wu, J, Hwang, EC & Lee, SW (2011) Characterization of two metagenome-derived esterases that reactivate chloramphenicol by counteracting chloramphenicol acetyltransferase. *J Microbiol Biotechnol* **21**(12):1203-1210.
179. Navarro-Fernandez J, Nechitaylo, TY, Guerrero, JA, Golyshina, OV, Garcia-Carmona, F, Sanchez-Ferrer, A & Golyshin, PN (2011) A novel platelet-activating factor acetylhydrolase discovered in a metagenome from the earthworm-associated microbial community. *Environ Microbiol* **13**(11):3036-3046.
180. Bunterngsook B, Kanokratana, P, Thongaram, T, Tanapongpipat, S, Uengwetwanit, T, Rachdawong, S, Vichitsoonthonkul, T & Eurwilaichitr, L (2010) Identification and characterization of lipolytic enzymes from a peat-swamp forest soil metagenome. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**(9):1848-1854.
181. Jeon JH, Kim, JT, Kang, SG, Lee, JH & Kim, SJ (2009) Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic sediment metagenome. *Mar Biotechnol (NY)* **11**(3):307-316.
182. Flardh K & Buttner, MJ (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7**(1):36-49.
183. Hopwood DA (2006) Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet* **40**:1-23.
184. Chater KF, Biro, S, Lee, KJ, Palmer, T & Schrempf, H (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* **34**(2):171-198.
185. Bentley SD, Chater, KF, Cerdeno-Tarraga, AM, Challis, GL, Thomson, NR, James, KD, Harris, DE, Quail, MA, Kieser, H, Harper, D, Bateman, A, Brown, S, Chandra, G, Chen, CW, Collins, M, Cronin, A, Fraser, A, Goble, A, Hidalgo, J, Hornsby, T, Howarth, S, Huang, CH, Kieser, T, Larke, L, Murphy, L, Oliver, K,

- O'Neil, S, Rabbino-witsch, E, Rajandream, MA, Rutherford, K, Rutter, S, Seeger, K, Saunders, D, Sharp, S, Squares, R, Squares, S, Taylor, K, Warren, T, Wietzorrek, A, Woodward, J, Barrell, BG, Parkhill, J & Hopwood, DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**(6885):141-147.
186. Alvarez HM & Steinbuchel, A (2002) Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(4):367-376.
187. Arabolaza A, Rodriguez, E, Altabe, S, Alvarez, H & Gramajo, H (2008) Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* **74**(9):2573-2582.
188. Packter NM & Olukoshi, ER (1995) Ultrastructural studies of neutral lipid localisation in *Streptomyces*. *Arch Microbiol* **164**(6):420-427.
189. Olukoshi ER & Packter, NM (1994) Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* **140** (Pt 4):931-943.
190. Kaddor C, Biermann, K, Kalscheuer, R & Steinbuchel, A (2009) Analysis of neutral lipid biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* MA-4680 and characterization of an acyltransferase involved herein. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**(1):143-155.
191. Popova NI, Krivova, AY, Rastimeshina, O & Burtseva, SA (2005) Interrelation of the biosyntheses of lipids, lipoxygenase, and lipase in cultured streptomycetes. *Microbiology* **74**(5):624-626.
192. Shim MS, Kim, WS & Kim, JH (1997) Neutral lipids and lipase activity for actinorhodin biosynthesis of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biotechnol Lett* **19**(3):221-223.
193. Gandolfi R, Marinelli, F, Lazzarini, A & Molinari, F (2000) Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. *J Appl Microbiol* **89**(5):870-875.
194. Large KP, Mirjalili, N, Osborne, M, Peacock, LM, Zormpaidis, V, Walsh, M, Cavanagh, ME, Leadlay, PF & Ison, AP (1999) Lipase activity in Streptomycetes *Enzyme Microb Technol* **25**:569-575.
195. Tao W, Lee, MH, Wu, J, Kim, NH & Lee, SW (2011) Isolation and characterization of a family VII esterase derived from alluvial soil metagenomic library. *J Microbiol* **49**(2):178-185.

196. Sommer P, Bormann, C & Götz, F (1997) Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl Environ Microbiol* **63**(9):3553-3560.
197. Bielen A, Cetkovic, H, Long, PF, Schwab, H, Abramic, M & Vujaklija, D (2009) The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl)esterase and a true lipase activity. *Biochimie* **91**(3):390-400.
198. Côté A & Shareck, F (2008) Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme Microb Technol* **42**:381-388.
199. Soror SH, Rao, R & Cullum, J (2009) Mining the genome sequence for novel enzyme activity: characterisation of an unusual member of the hormone-sensitive lipase family of esterases from the genome of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Protein Eng Des Sel* **22**(6):333-339.
200. Valdez F, Gonzalez-Ceron, G, Kieser, HM & Servin-Gonzalez, L (1999) The *Streptomyces coelicolor* A3(2) lipAR operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator. *Microbiology* **145** (9):2365-2374.
201. Severac E, Galy, O, Turon, F, Monsan, P & Marty, A (2011) Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. *Bioresour Technol* **102**(8):4954-4961.
202. Jaeger KE, Ransac, S, Dijkstra, BW, Colson, C, van Heuvel, M & Misset, O (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**(1):29-63.
203. Kim HK, Jung, Y, Choi, W, Ryu, HS, Oh, T & Lee, J (2004) Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiol Lett* **235**:349-355.
204. Ikeda H, Ishikawa, J, Hanamoto, A, Shinose, M, Kikuchi, H, Shiba, T, Sakaki, Y, Hattori, M & Omura, S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**(5):526-531.
205. Bendtsen JD, Nielsen, H, von Heijne, G & Brunak, S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**(4):783-795.
206. Rajasekar VW, Tambe, A & Datla, A (2013) Immobilization and characterization of recombinant *Candida antarctica* lipase B on poly(glycidyl methacrylate-*ter*-divinylbenzene-*ter*-ethylene dimethacrylate) beads, "DILBEADS TM TA ". *Biocatal Biotransform Early Online*:1-10.

207. Sandoval G & Marty, A (2007) Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme Microb Technol* **40**:390-393.
208. Zhang JH, Lin, Y, Sun, YF, Ye, YR, Zheng, SP & Han, SY (2012) High-throughput screening of B factor saturation mutated *Rhizomucor miehei* lipase thermostability based on synthetic reaction. *Enzyme Microb Technol* **50**(6-7):325-330.
209. Wu XY, Jaaskelainen, S & Linko, YY (1996) An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. *Enzyme Microb Technol* **19**(3):226-231.
210. Choi JH, Keum, KC & Lee, SY (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Sci* **61**:876-885.
211. Garcia-Fruitos E, Gonzalez-Montalban, N, Morell, M, Vera, A, Ferraz, RM, Aris, A, Ventura, S & Villaverde, A (2005) Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact* **4**:27.
212. Gatti-Lafranconi P, Natalello, A, Ami, D, Doglia, SM & Lotti, M (2011) Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology. *FEBS J* **278**(14):2408-2418.
213. Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**(5):411-421.
214. Choi JH, Keum, KC & Lee, SY (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Sci* **61**:876-885.
215. Potvin G, Ahmad, A & Zhang, Z (2012) Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Bioche Eng J* **64**:91-105.
216. Cregg JM, Cereghino, JL, Shi, J & Higgins, DR (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* **16**(1):23-52.
217. Huang Y, Chen, Y, Mo, D, Cong, P & He, Z (2012) Attenuated secretion of the thermostable xylanase xynB from *Pichia pastoris* using synthesized sequences optimized from the preferred codon usage in yeast. *J Microbiol Biotechnol* **22**(3):316-325.
218. Markaryan A, Beall, CJ & Kolattukudy, PE (1996) Inhibition of *Aspergillus* serine proteinase by *Streptomyces* subtilisin inhibitor and high-level expression of this inhibitor in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* **220**(2):372-376.

219. Thomas L & Crawford, DL (1998) Cloning of clustered *Streptomyces viridosporus* T7A lignocellulose catabolism genes encoding peroxidase and endoglucanase and their extracellular expression in *Pichia pastoris*. *Can J Microbiol* **44**(4):364-372.
220. Côté A (2010) *Identification et caractérisation de nouvelles enzymes lipolytiques thermostables provenant d'une banque métagénomique*. Mémoire de maîtrise (Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier). 139 pages.
221. Meilleur C (2009) *Isolement et caractérisation d'enzymes lipolytiques par criblage d'une banque métagénomique*. Mémoire de maîtrise (Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier). 128 pages.
222. Du W, Li, W, Sun, T, Chen, X & Liu, D (2008) Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**(3):331-337.
223. Lee SY, Choi, JH & Xu, Z (2003) Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* **21**(1):45-52.
224. van Bloois E, Winter, RT, Kolmar, H & Fraaije, MW (2011) Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **29**(2):79-86.
225. Xu Y, Yasin, A, Tang, R, Scharer, JM, Moo-Young, M & Chou, CP (2008) Heterologous expression of lipase in *Escherichia coli* is limited by folding and disulfide bond formation. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**(1):79-87.
226. Dubal SA, Tilkari, YP, Momin, SA & Borkar, IV (2008) Biotechnological routes in flavour industries. *Advanced Biotech* **6**(9): (<http://www.advancedbiotech.in/>),
227. Berger RG (2009) Biotechnology of flavours-the next generation. *Biotechnol Lett* **31**(11):1651-1659.
228. Longo MA & Sanroman, MA (2006) Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies *Food Technol Biotechnol* **44**(3):335-353.
229. *US Code of Federal Regulations*. (21) 101.22a.3. (1985) Food and Drug Administration. Washington, D.C.
230. *The Council of the European Communities*. (1988L0388) 88/388/EEC (1988) European Commission.
231. Serra S, Fuganti, C & Brenna, E (2005) Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol* **23**(4):193-198.
232. Franssen M, Alessandrini, L & Terraneo, G (2005) Biocatalytic production of flavors and fragrances. *Pure Appl. Chem.* **77**(1):273-279.

233. Kwon DY, Hong, YJ & Yoon, SH (2000) Enantiomeric synthesis of (*S*)-2-methylbutanoic acid methyl ester, apple flavor, using lipases in organic solvent. *J Agric Food Chem* **48**(2):524-530.
234. Ozyilmaz G & Gezer, E (2010) Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *J Mol Cat B Enz* **64**:140-145.
235. Romero MD, Calvo, L, Alba, C, Habulin, M, Primožic, M & Knez, Z (2005) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* **33**(1):77-84.
236. Kumar R, Modak, J & Madras, G (2005) Effect of chain length of the acid on the enzyme synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. *Biochem Eng J* **23**:199-202.
237. Horchani H, Ouertani, S, Gargouri, Y & Sayari, A (2009) The N-terminal His-tag and the recombination process affect the biochemical properties of *Staphylococcus aureus* lipase produced in *Escherichia coli*. *J Mol Cat B Enz* **61**:194-201.
238. Horchani H, Sabrina, L, Régine, L, Sayari, A, Gargouri, Y & Verger, R (2010) Heterologous expression and N-terminal His-tagging processes affect the catalytic properties of staphylococcal lipases: A monolayer study. *J Colloid Interface Sci* **350**:586-594.
239. Klibanov AM (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**(6817):241-246.
240. Majumder AB, Shah, S & Gupta, MN (2007) Enantioselective transacetylation of (*R,S*)-beta-citronellol by propanol rinsed immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Chem Cent J* **1**:10.
241. Garlapati VK & Banerjee, R (2013) Solvent-free synthesis of flavour esters through immobilized lipase mediated transesterification. *Enzyme Res* **2013**:367410.
242. Sowbhagya HB & Chitra, VN (2010) Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Crit Rev Food Sci Nutr* **50**(2):146-161.
243. Du W, Liu, D, Li, L & Dai, L (2007) Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a *tert*-butanol system. *Biotechnol Prog* **23**(5):1087-1090.

244. Romero MD, Calvo, L, Alba, C, Daneshfar, A & Ghaziaskar, HS (2005) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in *n*-hexane. *Enz Microb Technol* **37**:42-48.
245. Romero MD, Calvo, L, Alba, C & Daneshfar, A (2007) A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in *n*-hexane. *J Biotechnol* **127**:269-277.
246. Krishna SH, Divakar, S, Prapulla, SG & Karanth, NG (2001) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J Biotechnol* **87**:193-201.
247. Chen RR (2007) Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**(4):730-738.
248. Garcia MT, Campos, E, Sanchez-Leal, J & Ribosa, I (1999) Effect of the alkyl chain length on the anaerobic biodegradability and toxicity of quaternary ammonium based surfactants. *Chemosphere* **38**(15):3473-3483.
249. Webb C, Kang, HK, Moffat, G, Williams, RA, Estevez, AM, Cuellar, J, Jaraiz, E & Galan, MA (1996) The magnetically stabilized fluidized bed bioreactor: a tool for improved mass transfer in immobilized enzyme systems? *Chem Eng J* **61**:241-246.
250. Liu CZ, Wang, F & Ou-Yang, F (2009) Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. *Bioresour Technol* **100**(2):878-882.
251. Hill G (2003) Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur J Lipid Sci Technol* **105**:601-607.
252. Steinmann B, Christmann, A, Heiseler, T, Fritz, J & Kolmar, H (2010) *In vivo* enzyme immobilization by inclusion body display. *Appl Environ Microbiol* **76**(16):5563-5569.
253. Mateos-Diaz E, Rodriguez, JA, de Los Angeles Camacho-Ruiz, M & Mateos-Diaz, JC (2012) High-throughput screening method for lipases/esterases. *Methods Mol Biol* **861**:89-100.
254. Valkova N, Lepine, F, Bollet, C, Dupont, M & Villemur, R (2002) *prbA*, a gene coding for an esterase hydrolyzing parabens in *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter gergoviae* strains. *J Bacteriol* **184**(18):5011-5017.

255. Go AR, Lee, Y, Kim, YH, Park, S, Choi, J, Lee, J, Han, SO, Kim, SW & Park, C (2013) Enzymatic coproduction of biodiesel and glycerol carbonate from soybean oil in solvent-free system. *Enzyme Microb Technol* **53**(3):154-158.
256. Helander IM & Mattila-Sandholm, T (2000) Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. *J Appl Microbiol* **88**(2):213-219.
257. Vaara M (1993) Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**(11):2255-2260.
258. Ayorinde FO, Gelain, SV, Johnson, JH, Jr. & Wan, LW (2000) Analysis of some commercial polysorbate formulations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**(22):2116-2124.
259. Lutz S (2010) Beyond directed evolution--semi-rational protein engineering and design. *Curr Opin Biotechnol* **21**(6):734-743.
260. Otten LG, Hollmann, F & Arends, IW (2010) Enzyme engineering for enantioselectivity: from trial-and-error to rational design? *Trends Biotechnol* **28**(1):46-54.
261. Sandstrom AG, Wikmark, Y, Engstrom, K, Nyhlen, J & Backvall, JE (2012) Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(1):78-83.
262. Juhl PB, Doderer, K, Hollmann, F, Thum, O & Pleiss, J (2010) Engineering of *Candida antarctica* lipase B for hydrolysis of bulky carboxylic acid esters. *J Biotechnol* **150**(4):474-480.
263. Shiloach J & Fass, R (2005) Growing *E. coli* to high cell density-a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv* **23**(5):345-357.
264. Huang CJ, Lin, H & Yang, X (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**(3):383-399.
265. Bhandari P & Gowrishankar, J (1997) An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol* **179**(13):4403-4406.
266. Jana S & Deb, JK (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**(3):289-298.

267. Kosinski MJ, Rinas, U & Bailey, JE (1992) Isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* **36**:782-784.
268. Choi YJ, Morel, L, Le Francois, T, Bourque, D, Bourget, L, Groleau, D, Massie, B & Miguez, CB (2010) Novel, versatile, and tightly regulated expression system for *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* **76**(15):5058-5066.
269. Brault G, Shareck, F, Hurtubise, Y, Lepine, F & Doucet, N (2012) Isolation and characterization of EstC, a new cold-active esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS One* **7**(3):e32041.
270. Wang J, Wang, D, Wang, B, Mei, ZH, Liu, J & Yu, HW (2012) Enhanced activity of *Rhizomucor miehei* lipase by directed evolution with simultaneous evolution of the propetide. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**(2):443-450.
271. Brault G, Shareck, F, Hurtubise, Y, Lepine, F & Doucet, N (2014) Short-Chain Flavor Ester Synthesis in Organic Media by an *E. coli* Whole-Cell Biocatalyst Expressing a Newly Characterized Heterologous Lipase. *PLoS One* **9**(3):e91872.