



**HAL**  
open science

# Procédé enzymatique intensifié et durable de N-acylation d'acides aminés en milieux éocompatibles : caractérisation, cinétiques et immobilisation de nouveaux biocatalyseurs

Mohamed Chafik Bourkaib

► **To cite this version:**

Mohamed Chafik Bourkaib. Procédé enzymatique intensifié et durable de N-acylation d'acides aminés en milieux éocompatibles : caractérisation, cinétiques et immobilisation de nouveaux biocatalyseurs. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0114 . tel-03004673

**HAL Id: tel-03004673**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03004673v1>**

Submitted on 1 Oct 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



SIMPPE



UNIVERSITÉ DE LORRAINE (UL)

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

École Doctorale Sciences et ingénierie des molécules, des produits, des procédés, et de l'énergie (SIMPPE)

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

THÈSE

Soutenance le 12 octobre 2020

Par

Mohamed Chafik BOURKAIB

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention Procédés Biotechnologiques

---

Sujet

PROCEDE ENZYMATIQUE INTENSIFIE ET DURABLE DE N-  
ACYLATION D'ACIDES AMINÉS EN MILIEUX ECOCOMPATIBLES :  
CARACTERISATION, CINETIQUES ET IMMOBILISATION DE  
NOUVEAUX BIOCATALYSEURS

---

**Membres du jury**

**Rapporteurs :** Mr Pedro Lozano Professeur, Université de Murcia, ESPAGNE

Mr Éric Dubreucq Professeur, SupAgro, Montpellier

**Examineurs :** Mme Catherine Sarazin Professeur, Université de Picardie, GEC, Amiens

Mlle Caroline Paul Prof. assistante, TU Delft, Delft, PAYS-BAS

Mme Catherine Humeau Professeur, UL, LRGP, Nancy

Mr Stéphane Delaunay Professeur, UL, LRGP, Nancy

**Directrice :** Mme Isabelle Chevalot Professeur, UL, LRGP, Nancy

**Co-directeur :** Mr Yann Guiavarc'h Maître de conférences, UL, LRGP, Nancy







## Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à Mr Pedro Lozano et Mr Eric Dubreucq de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs ainsi que Mme Catherine Sarazin et Mlle Caroline Paul d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été menés au sein de l'équipe BioProMo du laboratoire des réactions et génies des procédés (LRGP). Je souhaite donc remercier Mr Laurent Falk directeur du LRGP de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens aussi tout particulièrement à présenter toute ma reconnaissance et remerciements particuliers à Mme Isabelle Chevalot, (directrice de thèse), Mr Yann Guiavarc'h, (co-directeur) ainsi qu'à Mr Stéphane Delaunay, Mme Catherine Humeau et Mr Xavier Framboisier pour votre encadrement scientifique avisé, votre présence, vos conseils et votre soutien. Un grand merci à Mr Fabrice Blanchard pour ta disponibilité, ton soutien et tes conseils techniques et analytiques ainsi qu'à Mr Arnaud Aymes pour ton soutien moral et technique, en particulier sur SVS.

Je souhaite également remercier l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) d'avoir financé le projet ISEAPIM3 dont fait partie ainsi que toutes les personnes qui ont contribué au travail de thèse et avec qui nous avons collaboré. Je pense notamment à Cédric pour les analyses, à Brigitte, Jean-Luc, Pierrick, Francois et Armand pour les matériaux et les immobilisations d'enzymes ainsi qu'à Cecile, Estelle, Jerome et toute l'équipe de SEPPIC pour les analyses biologiques et pour votre accueil chaleureux pendant les quelques jours très enrichissants.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire en particulier mes collègues et amis anciens et nouveaux thésards, poste doc et technicien du LRGP site ENSAIA, ENSIC et SVS ainsi que du L2CM, sans cité de nom afin de n'oublier personne, pour votre soutien moral et pour tous les rires, les blagues et les beaux moments passer ensemble. Je suis très heureuse de vous avoir rencontré et j'espère qu'on restera toujours en contact.

Un remerciement particulier à mes collègues enseignants Jérémy, Jénifer, Latifa et Bruno qui m'ont soutenu lors de la période d'enseignement et à tous mes stagiaires pour leur rigueur et leur sérieux.

Finalement, un très grand merci aux personnes qui me sont très chères (ma famille et mes amis), sans qui, les choses n'auraient que peu de sens.





# Sommaire

Introduction générale.....	1
1 Chapitre I : Étude bibliographique .....	7
1.1 Acylation d'acides aminés .....	7
1.1.1 Les acides aminés acylés.....	7
1.1.2 Activités biologiques des surfactants à base d'acides aminés.....	9
1.1.3 Caractéristiques structurales des AAS et paramètres influençant leur efficacité .....	11
1.1.4 Toxicité et biodégradabilité des AAS.....	12
1.1.5 Synthèse <i>in vivo</i> de surfactants à base d'acides aminés.....	14
1.1.6 Synthèse <i>in vitro</i> de surfactants à base d'acides aminés.....	15
1.1.6.1 Acylation des acides aminés par voie chimique .....	15
1.1.6.2 Acylation des acides aminés par voie enzymatique.....	17
1.1.6.3 Acylation des acides aminés par voie chimio-enzymatique.....	18
1.2 Réaction d'acylation enzymatique en milieu non aqueux.....	19
1.2.1 Enzymes catalysant la réaction d'acylation en milieu non aqueux .....	19
1.2.2 Structure et mécanisme catalytique des lipases.....	21
1.2.3 Paramètres influençant les réactions en milieu non-aqueux .....	23
1.2.3.1 Influence de la teneur en eau .....	23
1.2.3.2 Influence de l'état d'ionisation .....	25
1.2.3.3 Impact de la température .....	26
1.2.3.4 Influence du substrat et du choix du solvant réactionnel .....	26
1.2.4 Acylation enzymatique sous CO <sub>2</sub> supercritique.....	29
1.2.4.1 Les fluides supercritiques et le CO <sub>2</sub> .....	29
1.2.4.2 Paramètres influençant les réactions sous CO <sub>2</sub> supercritique.....	31
1.2.4.2.1 Solubilité et solubilisation des composés.....	31
1.2.4.2.2 Influence de l'eau sur l'activité enzymatique.....	33

1.2.4.2.3	Influence des conditions opératoires (température, pression et cycle de dépressurisation).....	35
1.2.5	Acylation enzymatique dans les liquides ioniques .....	38
1.2.6	Acylation enzymatique en solvants eutectiques profonds .....	40
1.3	Réaction d'acylation enzymatique en milieu aqueux .....	45
1.3.1	Enzymes catalysant la réaction d'acylation en milieu aqueux .....	45
1.3.2	Influence des conditions opératoires sur les performances catalytiques des acylases .....	48
1.3.2.1	Influence du pH.....	49
1.3.2.2	Influence de la température .....	50
1.3.2.3	Influence des coactivateurs métalliques et inhibition de l'activité enzymatique .....	50
1.3.3	Acylation enzymatique d'acides aminés par les aminoacylases en milieu aqueux ... ..	52
1.3.3.1	Les pénicillines acylases (EC 3.5.1.11).....	52
1.3.3.2	L'épsilon lysine acylase (EC 3.5.1.17).....	53
1.3.3.3	Les aminoacylases I (EC 3.5.1.14).....	54
1.4	Immobilisation d'enzymes .....	57
1.4.1	Matériaux utilisés pour l'immobilisation d'enzymes .....	58
1.4.1.1	Matériaux à base de polymères naturels.....	58
1.4.1.2	Matériaux à base de polymères synthétiques.....	59
1.4.1.3	Matériaux à base de silice.....	60
1.4.1.4	Matériaux à base de carbone.....	60
1.4.1.5	Les supports magnétiques.....	62
1.4.2	Caractéristiques du support .....	62
1.4.3	Techniques d'immobilisation .....	65
1.4.3.1	Immobilisation par adsorption .....	65
1.4.3.2	Immobilisation par chimisorption.....	68

1.4.3.3	Encapsulation.....	71
1.4.3.4	Immobilisation par réticulation.....	72
1.5	Approches utilisées pour l'intensification de procédés enzymatiques .....	72
1.5.1	Le type de réacteur.....	73
1.5.2	Procédés assistés par micro-ondes.....	79
2	Chapitre II : Matériels et méthodes.....	83
2.1	Biocatalyseurs utilisés.....	83
2.1.1	Production des aminoacylases.....	84
2.1.2	Traitement des surnageants de culture.....	85
2.1.2.1	Lyse des cellules .....	85
2.1.2.2	Précipitation des protéines.....	85
2.1.2.3	Diafiltration et concentration des protéines.....	86
2.1.3	Expression hétérologue des aminoacylases de <i>S. ambofaciens</i> chez <i>E. coli</i> Origami B (DE3) .....	86
2.2	Immobilisation des aminoacylases de <i>S. ambofaciens</i> et de CALB.....	89
2.2.1	Synthèse des matériaux à base de silice.....	90
2.2.2	Fonctionnalisation des matériaux .....	90
2.2.3	Immobilisation des enzymes .....	91
2.2.4	Caractérisation des matériaux .....	93
2.2.5	Autres types d'immobilisation .....	93
2.3	Mise en œuvre des réactions enzymatiques .....	93
2.3.1	Réactifs utilisés.....	94
2.3.2	Réactions en continu sous CO <sub>2</sub> supercritique (scCO <sub>2</sub> ).....	94
2.3.3	Réaction en batch dans des réacteurs agités mécaniquement .....	96
2.3.3.1	Synthèse enzymatique .....	96
2.3.3.1.1	Solvant organique en réacteur agité.....	96
2.3.3.1.2	En milieu aqueux .....	97

2.3.3.2	Hydrolyse enzymatique.....	98
2.4	Méthodes analytiques.....	98
2.4.1	Réactifs et solvants .....	98
2.4.2	Chromatographie sur couche mince (CCM ; analyse qualitative).....	99
2.4.3	Dosage de la lysine issue des réactions d'hydrolyse .....	100
2.4.4	Dosage des acides aminés acylés produits et des acides gras consommés lors des réactions de N-acylation.....	103
2.4.5	Identification de la régiosélectivité et de la chimio-sélectivité des enzymes par CL-SM-SM.....	104
2.4.6	Dosage de l'acétate de géranol issu des réactions de O-acylation sous scCO <sub>2</sub> .....	105
2.4.7	Dosages des protéines .....	105
2.4.7.1	Bradford.....	105
2.4.7.2	BCA.....	106
2.5	Construction des structures .....	107
2.5.1	Structure des ligands.....	107
2.5.2	Structure de CALB et de l'acyl-CALB.....	107
2.5.2.1	Minimisation de l'énergie du système.....	108
2.5.2.2	Simulations de dynamique moléculaire .....	108
2.5.2.2.1	Analyses des résultats .....	109
2.5.2.2.2	Définition du site actif.....	110
2.5.2.3	Simulation de docking.....	110
3	Chapitre III : Performances des lipases pour la réaction d'acylation enzymatique des acides aminés.....	115
3.1	Introduction : .....	115
3.2	Acylation enzymatique catalysée par les lipases en solvant organique.....	116
3.3	Acylation enzymatique sous CO <sub>2</sub> supercritique .....	121
3.4	Acylation enzymatique en solvants eutectiques .....	127

3.5	Acylation enzymatique en milieu biphasique .....	131
3.6	Étude par modélisation moléculaire de l'acylation enzymatique des acides aminés, catalysée par CALB.....	133
3.6.1	Modélisation de l'acylation de la phénylalanine par l'acide oléique, catalysée par CALB .....	135
3.6.2	Modélisation de l'acylation des acides aminés par l'acide undécénoïque, catalysée par CALB .....	139
3.6.2.1	Construction du modèle d'acyl-enzyme C11'- CALB et sélection de la meilleure cible.....	139
3.6.2.2	Etude des modes d'interaction entre les acides aminés et l'acyl-enzyme C11'-CALB.....	142
3.7	Conclusions .....	146
4	Chapitre IV : Performances des acylases de <i>Streptomyces ambofaciens</i> comme catalyseurs de la réaction d'acylation enzymatique des acides aminés .....	151
4.1	Introduction .....	151
4.2	Evaluation des performances catalytiques des aminoacylases de <i>S. ambofaciens</i> pour l'acylation d'acides aminés.....	151
4.3	Contribution de l'article .....	165
4.4	Résultats complémentaires .....	166
4.4.1	Production hétérologue des aminoacylases.....	166
4.4.1.1	Evaluation de l'expression hétérologue des différentes aminoacylases de <i>S. ambofaciens</i> chez <i>E. coli</i> Origami B(DE3) .....	168
4.4.1.2	Evaluation de l'activité des extraits protéiques issus des souches d' <i>E. coli</i> Origami B(DE3) transformées .....	171
4.4.1.3	Purification de Sam-AA recombinante .....	174
4.4.2	Comparaison des performances catalytiques entre des extraits bruts d'une souche mutante n'exprimant que Sam-AA et de la souche sauvage de <i>S. ambofaciens</i> .....	175
4.4.2.1	Evaluation et comparaison de la spécificité de substrat envers les acides aminés ... ..	177

4.4.2.2	Comparaison de la spécificité de substrat envers les acides gras .....	178
4.5	Conclusion.....	181
5	Chapitre V : Evaluation des performances des aminoacylases de <i>Streptomyces ambofaciens</i> immobilisées .....	185
5.1	Introduction .....	185
5.2	Contribution de l'article .....	217
5.3	Résultats complémentaires .....	219
5.3.1	Performances des aminoacylases de <i>S. ambofaciens</i> immobilisées sur différents supports silicatés.....	219
5.3.2	Performances de la lipase B de <i>C. antarctica</i> immobilisée sur différents supports silicatés.....	226
5.4	Conclusion.....	235
6	Chapitre VI : mise en œuvre d'un procédé de production et de purification de l'undécénoyl-phénylalanine .....	241
6.1	Introduction .....	241
6.2	Evaluation des performances catalytiques des aminoacylases de <i>Streptomyces ambofaciens</i> pour l'acylation de la phénylalanine .....	241
6.3	Contribution de l'article .....	268
6.4	Conclusion.....	269
	Conclusion générale et perspectives.....	273
	Références.....	283

## Abréviations

CALB	Lipase B Candida antarctica
M <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	2-méthyl-2-butanol
CCM	Chromatographie sur couche mince
HPLC	High performance liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
MS2	Fragmentation mass spectrometrie
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
PDB	Protein Data Bank
RMSD	Root Mean Square Deviation
SBA-15	Santa Barbara amorphous 15
MMS	Mesoporous-macroporous support
SiHIPE	High Internal Phase Emulsion
scCO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> supercritique
MEP ou DES	Mélanges Eutectiques Profonds ou Deep Eutectic solvents
ILs	Liquides ioniques
ChCl	Chlorure de cholinium
U	Urée
Gly	Glycérol





## Liste des figures

### Chapitre I :

Figure 1.1 : structure des surfactants à base d'acides aminés.....	9
Figure 1.2 : réaction chimique (Schotten-Baumann) d'acylation d'une fonction amine .....	15
Figure 1.3 : procédure de synthèse de l' $\alpha$ -acyl-lysine (Shi et al., 2019).....	16
Figure 1.4 : représentation graphique de la structure secondaire de CALB, en jaune : la triade catalytique, en bleu : les résidus du trou oxyanion, flèches grises : les feuillets $\beta$ , et les cylindres grenade : les hélices $\alpha$ (Stauch et al., 2015).....	22
Figure 1.5 : Mécanisme d'acylation catalysé par la triade catalytique de CALB selon le modèle bi-bi ping-pong: A) conformation native et approche du substrat donneur d'acyle ; B) premier intermédiaire tétraédrique ; C) relargage de l'alcool et formation de l'acyl-enzyme ; D) approche de l'accepteur d'acyle ; E) formation du second intermédiaire tétraédrique ; F) relargage du produit et retour à la conformation initiale de l'enzyme (Ferrari, 2014a). .....	23
Figure 1.6 : diagramme de phase du CO <sub>2</sub> (www.EngineeringToolbox.com).....	30
Figure 1.7 : observation du passage de l'état liquide (a) à l'état supercritique (c) au cours du temps en passant par une étape de transition (b) suite à l'augmentation de la pression et de la température (Hobbs, Thomas, 2007).....	30
Figure 1.8 : représentation de la structure de CALB sous scCO <sub>2</sub> (Silveira et al., 2012).....	33
Figure 1.9 : schéma de la formation de liaisons carbamate entre la lysine en surface de l'enzyme et le CO <sub>2</sub> (A) et de la formation d'acide carbonique par dissolution de CO <sub>2</sub> dans le microenvironnement aqueux de l'enzyme (Budisa, Schulze-Makuch, 2014) .....	35
Figure 1.10 : évolution de la conformation des protéines selon la pression et la température du scCO <sub>2</sub> utilisé, A : faible pression et température, B : faible température et pression élevé, C : faible pression et température élevé, D : pression et température élevé (Hoang et al., 2018)..	36
Figure 1.11 : Schéma du diagramme de phase d'un mélange eutectique (A) et un exemple d'interaction hydrogène possible dans le MEP chlorure de cholinium / urée (B) (Pätzold et al., 2019).....	41
Figure 1.12 : mécanisme catalytique de la pénicilline G acylase (Srirangan et al., 2013).....	47
Figure 1.13 : mécanisme catalytique de l'aspartoacylase (Bitto et al., 2007) .....	48
Figure 1.14 : taux de synthèse des acides aminés N-lauroylés. Conditions réactionnelles : acide laurique (7,5 mM), acides aminés (200 mM), 10 unités/mL de l'extrait de <i>S. mobaraensis</i> dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,5 contenant 0.5 mM CoCl <sub>2</sub> et 78% de glycérol à 37°C durant 2 jours (Koreishi et al., 2006a).....	53

Figure 1.15 : couple pH/température d'hydrolyse optimale des N- $\alpha$ et $\epsilon$ -acétyl-L-lysine de l'extrait brut de <i>S. ambofaciens</i> . A : effet du pH à T = 37°C ; B : effet de la température à pH 8. Conditions expérimentales : tampon tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, 2 g/L d'extrait enzymatique et 4 mM du substrat pendant 24h (Ferrari, 2014a).	56
Figure 1.16 : représentation schématique des principaux supports d'immobilisation	58
Figure 1.17 : facteurs influençant les propriétés physicochimiques lors de l'immobilisation des enzymes sur du biochar (Pandey et al., 2020).	59
Figure 1.18 : représentation de l'organisation moléculaire des oxydes de graphène et des oxydes de graphène réduits (Jiali Zhang et al., 2010 ; Duan et al., 2015).	62
Figure 1.19 : classification des matériaux selon le diamètre des pores (A) et comparaison du diamètre des pores des supports mésoporeux ordonnés et du diamètre des enzymes (B ; (Zhou, Hartmann, 2013)).	64
Figure 1.20 : organisation d'un support avec une structure de pores hiérarchiquement ordonnés (Blin et al., 2006).	64
Figure 1.21 : les principales techniques d'immobilisation d'enzymes (à partir de Chapman, Stenzel, 2019).	65
Figure 1.22 : méthode de Co-condensation (A) et de greffage (B) des groupements organiques sur les supports à base de silice (R = groupement organique fonctionnel) et groupement fonctionnels généralement utilisé pour la modification de la surface des supports (C) (Hartmann, Kostrov, 2013a ; Hoarau et al., 2017).	68
Figure 1.23 : interactions possibles entre l'enzyme et le support fonctionnalisé avec de l'APTES (Bernal, Poveda-Jaramillo, et al., 2018)	68
Figure 1.24 : schéma des différents point d'ancrage possibles de l'enzyme sur un support, A : un seul vs plusieurs points d'encrage, B : ancrage avec des spacers de différentes longueurs (Hoarau et al., 2017)	69
Figure 1.25 : représentation schématique du système de type SpinChem®	74
Figure 1.26 : A. représentation schématique de quelques configuration internes de mélanges stationnaires : (a) structures simples de mise en contact, (b) structure multi-laminaire, (c) structure courbée ou sous forme d'hélicoïdale, (d) structures en split-recombiné et (e) structure statique périodique (Zhang et al., 2017), B. configuration des microréacteurs simples, C. réacteur microstructuré sous forme de goutte optimisé par Mielke et al., 2018, D. réacteur microstructuré commercialisé sous le nom de Corning Advanced Flow Reactor (a) vue d'ensemble du réacteur avec entré des substrats et enzymes en solution (point rouge), sortie du réacteur (point vert) et entré et sortie de l'échangeur de chaleur (point bleu), (b) structure du	

mélangeur statique sous forme de cœur, (c) schéma d'une coupe transversale du réacteur (Nieves-Remacha et al., 2012).....76

## **Chapitre II :**

Figure 2.1 : carte plasmidique de pET-15b avec ses principales caractéristiques .....87

Figure 2.2 : influence de la concentration du tampon par rapport à la concentration d'enzyme initiale sur le pourcentage d'immobilisation.....92

Figure 2.3: Equipements utilisés pour la mise en œuvre des réactions enzymatiques sous scCO<sub>2</sub> dans les conditions standards .....96

Figure 2.4 : A. Réacteur Wheaton® B. Réacteur Optimax® .....98

Figure 2.5 : Schéma de la chaîne CLHP et des équipements utilisés pour le dosage des acides aminés ..... 101

Figure 2.6 : Réaction de dérivatisation des acides aminés ..... 102

Figure 2.7 : Représentation des orientations du ligand au niveau du site actif (Venkatachalam et al., 2003) ..... 111

## **Chapitre III :**

Figure 3.1 : analyse LC-MS-MS des produits de la réaction d'acylation de la lysine A. suivi MS de l'élution du produit monoacylé (313 m/z) au cours du temps B. fragmentation MS<sup>2</sup> du produit issu de la réaction (temps de rétention 9,26 min) correspondant à l' $\epsilon$ -10-undécényl-lysine C. fragmentation MS<sup>2</sup> de l' $\alpha$ -undécényl-lysine à titre de comparaison. ....118

Figure 3.2 : fragmentation MS<sup>2</sup> du 10-undécényl-glycine A. fragmentation MS<sup>2</sup> du produit de la réaction de synthèse en présence de CALB B. fragmentation MS<sup>2</sup> du produit de référence ..... 120

Figure 3.3 : configuration du système sous scCO<sub>2</sub> utilisé A. configuration initiale B. configuration modifiée..... 123

Figure 3.4 : spectre FTIR de CALB immobilisé non traité et traité avec du scCO<sub>2</sub> pendant 1 h à 10 MPa et 6 h à 20 MPa et à 40°C a. spectre FTIR complet b. spectre FTIR normalisé à un intervalle de nombre d'ondes de 1800-1500 cm<sup>-1</sup> (Dos Santos, Rezende, et al., 2016b).....126

Figure 3.5 : A. spectre FTIR normalisé à un intervalle de nombre d'ondes de 1800-1500 cm<sup>-1</sup> de CALB immobilisée (Lipozyme 435) avant et après traitement (55°C 200 Bar) avec du scCO<sub>2</sub> pendant 30 min à 200 Bar et à 55°C B. spectre FTIR caractéristique de l'acétate de géraniol ..... 127

Figure 3.6 : suivi de l'évolution de l'activité de l'eau du mélange eutectique profond choline chlorure / urée (ratio molaire 1 / 2) en fonction de la quantité d'eau ajoutée. .... 129

Figure 3.7: chromatogrammes HPLC-fluorimètre des mélanges réactionnels a. Réaction d'acylation de la phénylalanine en présence de 0,5 g/L de CALB libre dans de la choline chlorure / urée réalisé à $45 \pm 5^\circ\text{C}$ , b. Réaction d'acylation de la phénylalanine en présence de 10 g/L de CALB immobilisé dans de la choline chlorure / urée réalisé à $55 \pm 5^\circ\text{C}$ , c. a. Réaction d'acylation de la phénylalanine en présence de 0,5 g/L de CALB libre dans de la choline chlorure / glycérol réalisé à $55 \pm 5^\circ\text{C}$ .....	131
Figure 3.8 : analyse des poses issues du docking moléculaire de la phénylalanine avec l'oléoyl-CALB comme cible a. localisation et répartition des ligands générés au niveau de la cavité du site actif b. interactions moléculaires observées entre la phénylalanine et l'entrée du site actif (1 et 2) ; interactions moléculaires entre le site actif et la phénylalanine présentant son cycle aromatique vers les résidus catalytiques (3 et 4) (--- : interactions hydrophobes, --- : interactions hydrogènes) c. poses présentant la fonction amine de la phénylalanine à proximité des résidus catalytiques ; analyse des distances impliquées dans le mécanisme catalytique .....	138
Figure 3.9 : suivi de l'évolution de l'énergie totale du système (a) et de la température (b) au cours de la dynamique moléculaire .....	140
Figure 3.10 : distribution des cibles générées au cours de la trajectoire de dynamique moléculaire selon le nombre de critères de distance respectés au sein du trou oxyanion (a) ; un exemple de conformation respectant l'ensemble des critères de distance assurant un positionnement et une stabilisation corrects de l'acyl-enzyme (b) .....	141
Figure 3.11 : exemple d'une conformation de l'acyl-enzyme présentant une bonne accessibilité des molécules d'eau aux résidus catalytiques .....	141
Figure 3.12 : Nombre de poses générées au cours des simulations de docking moléculaire de différents acides aminés sur la cible C11'-CALB.....	142
Figure 3.13 : localisation des ligands au sein des poses générées au cours des simulations de docking de différents acides aminés dans la cible C11'-CALB. ....	143
Figure 3.14 : interactions observées entre l'arginine (a), ou la phénylalanine (b) et les résidus de l'entrée de la cavité catalytique (--- et --- interactions hydrogènes, --- interactions hydrophobes, --- interactions électrostatiques) .....	145
Figure 3.15 : pourcentage des poses respectant les critères de distance soit avec la fonction amine de la chaîne principale, soit avec le groupement nucléophile de la chaîne latérale de l'acide aminé (histogrammes en jaune : ligands classés en premier suite au scoring).....	146

## **Chapitre IV :**

Figure 4.1 : Suivi de la densité optique du milieu de culture, à 600nm, lors de l'expression protéique chez les souches *E. coli* Origami B(DE3) transformées par les plasmides pET15b/ SamAA, pET-15b/ SamPVA ou pET-15b/ SamELA ; et la souche non transformée. Le moment d'induction est indiqué par la flèche noire (pour pET-15b/ SamAA, pET-15b/ Sam PVA, et *E. coli* Origami B (DE3)), et la flèche rouge (pour pET-15b/ SamELA)..... 169

Figure 4.2 : Électrophorèses SDS-PAGE des mélanges protéiques issues des cultures d'*E. coli* Origami B (DE3) non transformée (A), transformée avec le plasmide pET-15b/ sam-ELA (B), transformée avec le plasmide pET-15b/ sam-PVA (C), et transformée avec le plasmide pET-15b/ sam-AA (D). MW : Marqueur de taille (Unstained Precision Plus Protein Standards ; BioRad) ; I- : avant induction ; I+Xh : X heures après induction à 0,1mM IPTG. Les flèches rouges indiquent la position des protéines exprimées. .... 170

Figure 4.3 : Électrophorèse SDS-PAGE des mélanges protéiques issues des cultures d'*E. coli* Origami B (DE3) transformé avec le plasmide pET-15b/ sam-AA obtenus 24h après induction avec différentes concentrations d'IPTG. MW : Marqueur de taille (Unstained Precision Plus Protein Standards ; BioRad) ; I- : avant induction. La flèche rouge indique la position de Sam-AA exprimée. .... 171

Figure 4.4 : Électrophorèse SDS-PAGE des protéines issues de l'élution à différentes concentrations d'imidazole (élution 1 : 80 mM, élution 2 : 160 mM et élution 3 : 250 mM). MW : Marqueur de taille (Unstained Precision Plus Protein Standards ; BioRad). La flèche rouge correspond à la bande de la taille de Sam-AA. .... 175

Figure 4.5 : suivi cinétique de la réaction de synthèse de l' $\alpha$ -lauroyl-lysine en présence de l'extrait protéique issu de la souche sauvage et mutante. Réaction réalisée dans du tampon tris HCl 25 mM, 50mM NaCl pH 8 à 45°C, agitation à 500 rpm contenant 0.1 M des deux substrats et 1 g/L de protéines ..... 176

Figure 4.6 : pourcentage de conversion de l'acide 10-undécénoïque en présence des 20 acides aminés. Réaction réalisée pendant 24 h dans du tampon tris HCl 25 mM, 50 mM NaCl pH 8 à 45°C, agitation à 500 rpm contenant 0,1 M des deux substrats et 1 g/L de protéines (n=2).. 178

Figure 4.7 : pourcentage de conversion d'acides gras en présence de la lysine comme accepteur d'acyle. Réaction réalisée pendant 24 h dans du tampon tris HCl 25 mM, 50 mM NaCl pH 8 à 45°C, agitation à 500 rpm contenant 0,1 M des deux substrats et 1 g/L de protéines ..... 179

Figure 4.8 : suivi et spectre MS2 après fragmentation de l'acyl-lysine : A: souche sauvage de *S. ambofaciens* ; B : souche mutante de *S. ambofaciens*, pour la synthèse de (1) l'octanoyl-lysine ou (2) phénylpropionyl-lysine..... 180

## **Chapitre V :**

Figure 5.1 : schéma des interactions hydrogènes possibles entre les fonctions amines de l'APTES et l'enzyme (Kołodziejczak-Radzimska et al., 2018).....	218
Figure 5.2 : distribution de taille des mésopores par la méthode BJH (A) et des macropores par l'analyse de porosité au mercure (B) des SiHIPE.....	220
Figure 5.3 : observation en microscopie électronique à balayage (A) et à transmission (B) des SiHIPE.....	220
Figure 5.4 : quantité d'enzyme immobilisée sur les différents types de support (A), taux de conversion de l' $\alpha$ -acétyl-lysine en lysine (B) et suivi de l'évolution de l'activité suite à 2 recyclages des enzymes immobilisées (C). H : cycle d'hydrolyse de l' $\alpha$ -acétyl-lysine en lysine .....	222
Figure 5.5 : taux de conversion de l' $\alpha$ -acétyl-lysine en lysine (A) et activité hydrolytique relative suite à 2 recyclages des enzymes immobilisées, H : cycle d'hydrolyse de l' $\alpha$ -acétyl-lysine en lysine.....	224
Figure 5.6 : A. Activité de CALB immobilisée sur les différents SBA15 fonctionnalisés vs CALB commerciale immobilisée par adsorption sur des supports de polyméthacrylate divinylbenzène macroporeux (cycle : une réaction de synthèse de l'acétate de géraniol sous $scCO_2$ à 55°C et 200 bar suivi d'une dépressurisation rapide) B. composition de la solution de lipase utilisée pour l'immobilisation sans standardisation. ....	228
Figure 5.7 : A. Activité de CALB immobilisée sur les différents supports SBA15 fonctionnalisés vs CALB commerciale immobilisée sur des supports de méthacrylate divinylbenzène macroporeux (cycle : une réaction de synthèse d'acétate de géraniol sous $scCO_2$ à 55°C et 200 bars suivie d'une dépressurisation rapide), B. image de la structure 3D des deux faces de CALB obtenue par l'utilisation du logiciel Discovery studio .....	230
Figure 5.8 : Activité de CALB immobilisée sur les monolithes fonctionnalisés avec de l'isocyanate à différentes concentrations vs Lipozyme 435® (cycle : une réaction de synthèse de l'acétate de géraniol sous $scCO_2$ à 55°C et 200 bars pendant 30 min suivi d'une dépressurisation rapide).....	232

## **Chapitre VI :**

Figure 6.1 : procédures de purification évaluées et sélectionnées pour la purification du C11'F .....	269
---	-----

## Liste des tableaux

### Chapitre I :

Tableau 1-1 : Réactions catalysées par les lipases .....	21
Tableau 1-2 : propriétés thermo-physiques des liquides, gaz et fluides supercritiques (Attard, Hunt, 2018a).....	30
Tableau 1-3 : évolution de la viscosité des MEP après ajout de 10% v/v d'eau (Guajardo et al., 2017).....	44
Tableau 1-4 : caractéristiques et spécificités de différentes aminoacylases .....	51
Tableau 1-5 : activité de synthèse de différents lauroyl-acides aminés par les aminoacylases de Burkholderia sp. (Takakura, Asano, 2019).....	55
Tableau 1-6 : exemples d'utilisation de réacteurs intensifiés .....	77
Tableau 1-7 : exemple d'utilisation des micro-ondes et influence de l'utilisation des réacteurs à micro-ondes sur les performances enzymatiques.....	80

### Chapitre II :

Tableau 2-1 : Composition de la solution de CALB utilisée .....	83
Tableau 2-2 Composition des milieux utilisés lors des différentes étapes de culture de S. ambofaciens .....	85
Tableau 2-3 : Composition des gels et solutions utilisés pour les SDS-PAGE .....	89
Tableau 2-4: réactifs utilisés lors des réactions enzymatique .....	94
Tableau 2-5: Liste des produits utilisés pour les analyses des produits des réactions enzymatiques.....	99
Tableau 2-6 : Composition des réactifs utilisés pour la dérivatisation.....	100
Tableau 2-7 : Gradient de phases et composition des solvants d'élution.....	101
Tableau 2-8 : Gradient des solvants utilisés .....	102
Tableau 2-9 : conditions d'analyse des acides aminés avec la LC-MS.....	103
Tableau 2-10 : Composition et gradient des solvants d'élution pour les colonnes C18 amide et Biphényl.....	104
Tableau 2-11 : Composition et gradient des solvants d'élution des analyses en CL-SM-SM105	
Tableau 2-12 : Conditions implémentées lors des étapes de minimisation de l'énergie du système .....	108
Tableau 2-13: Conditions implémentées lors des étapes de dynamique moléculaire .....	109

### Chapitre III :

Tableau 3-1 : conditions réactionnelles lors de la synthèse du C11'F et du C8G sous scCO <sub>2</sub> .....	123
Tableau 3-2 : Résultats en solvants eutectiques après 24h, à une activité d'eau de 0,2.....	130
Tableau 3-3 : logP des différentes molécules utilisées lors des réactions .....	132
Tableau 3-4 : Protocole de minimisation du système acyl-enzyme et résultats associés .....	139
Tableau 3-5 : Résumé des résultats expérimentaux obtenus avec les lipases en milieux non- conventionnels et hypothèses sur les phénomènes mis en jeu. ....	148

#### **Chapitre IV :**

Tableau 4-1 : Activités spécifiques des extraits bruts des cultures d'E. coli Origami B (DE3) transformées et non transformée. ....	173
--	-----

#### **Chapitre V :**

Tableau 5-1 : tableau de synthèse des résultats de l'immobilisation des aminoacylases de S. ambofaciens sur les différents supports.....	225
Tableau 5-2 : tableau récapitulatif des résultats de l'immobilisation de CALB sur les différents supports.....	234



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

---



## Introduction générale

Le marché mondial des tensioactifs (surfactants), en particulier ceux issus de ressources naturelles, est en pleine croissance. En 2017, le chiffre d'affaire mondial des tensioactifs biosourcés était estimé à 13,5 milliards avec une croissance attendue de 5% d'ici 2022 (Le Guenic et al., 2019). Les acides aminés acylés constituent l'une des classes les plus importantes de molécules tensioactives naturelles. Ils proviennent de la condensation d'un acide aminé (accepteur d'acyle) et d'une molécule apolaire telle qu'un acide gras (donneur d'acyle). On parle alors de Lipo Acides Aminés (LAA) ou d'Amino-Acid-based Surfactants (AAS). Un LAA est une molécule amphiphile présentant une activité de surface élevée avec, dans certains cas, une activité biologique. En outre, les LAA biosourcés sont des biosurfactants souvent facilement biodégradables et leur éco-compatibilité font de ces derniers des molécules de choix pour les industries cosmétiques et pharmaceutiques, mais aussi dans le domaine du nettoyage et de l'agroalimentaire.

La voie privilégiée de production de ces LAA à l'échelle industrielle est la réaction chimique de Schotten-Baumann. Dans ce cas, l'acide aminé réagit avec un chlorure d'acide gras à pH fortement alcalin dans du TFA / eau ou en utilisant d'autres solvants organiques ce qui, malgré des rendements de synthèse élevés, entraîne des étapes de purification, générant de grands volumes d'effluents salins très coûteux à retraiter. De plus, aussi bien pour répondre à une pression sociétale et environnementale croissante qu'à des fins économiques, de plus en plus d'industries tentent de développer des technologies durables en passant de la dépollution en fin de procédé à la réduction de la quantité d'effluents polluants générés durant le procédé. D'une manière générale, les enzymes sont des biocatalyseurs qui, par leur spécificité de substrat, leur régio-, chimio- voire énantiosélectivité, et leur aptitude à fonctionner dans des conditions de pH et de température modérées, permettent d'éviter l'usage d'étapes de protection-déprotection chimique de groupements fonctionnels non-visés et de limiter les coûts de production associés. Les enzymes ont été largement décrites pour catalyser des réactions d'acylation, en particulier pour des réactions de O-acylation (estérification), mais beaucoup moins pour des réactions de N-acylation (amidation) d'acides aminés.

Dans ce contexte, la présente thèse a été financée dans le cadre d'un projet ANR dans l'appel à projet générique 2014-2015. Le projet, intitulé « Intensified & Sustainable Enzymatic Acylation Processes on Innovative Macroporous/Mesoporous Materials » (ISEAPIM3), s'inscrit dans le défi prioritaire 3.3. de l'ANR "stimuler le renouveau industriel" au travers de l'axe thématique 3.3.4 "Chimie Durable, produits, procédés associés". L'idée générale des

## Introduction générale

projets ANR associés à ces objectifs est de remplacer, quand cela est possible, des procédés chimiques de synthèse présentant des inconvénients (risques/coûts associés aux réactifs, aux procédés, aux produits secondaires et aux effluents à retraiter) par des procédés chimiques ou biologiques alternatifs plus respectueux de l'environnement. L'objectif principal de cette thèse était de développer un procédé de N-acylation enzymatique compétitif par rapport au procédé chimique actuellement utilisé pour la synthèse de lipoaminoacides (LAA).

Afin d'atteindre cet objectif, plusieurs aspects ont été étudiés et les résultats ont été répartis en plusieurs chapitres

Dans un premier temps, l'étude du meilleur couple enzyme / solvant réactionnel permettant l'acylation d'acides aminés en utilisant des solvants dits « verts » a été réalisée. Les travaux ont visé à :

- l'évaluation des performances de lipases en milieu non aqueux pour la réaction d'acylation d'acides aminés
- l'étude par modélisation moléculaire des interactions enzyme (CALB) / substrat (acides aminés)
- l'évaluation des performances des acylases en milieu aqueux pour la réaction de synthèse d'acide aminés acylés
- la comparaison des performances des deux types d'enzymes

Le choix du biocatalyseur et du milieu réactionnel le plus approprié à ce type de réaction est une étape cruciale pour la suite de cette étude. Les lipases font partie des enzymes les plus disponibles et les plus étudiées pour les réactions de O-acylation mais très peu pour les réactions de N-acylation d'acides aminés. Lors de cette étude, plusieurs couples lipases / solvants réactionnels tels que le CO<sub>2</sub> supercritique, les solvants eutectiques et les milieux bi-phasiques en plus des solvants organiques ont été évalués. Etant donné que la structure des lipases telles que CALB est bien connue, l'usage de la modélisation moléculaire peut permettre d'expliquer les résultats obtenus à l'échelle réactionnelle par l'étude des interactions entre l'enzyme et les substrats à l'échelle moléculaire. Cela constitue un outil très intéressant permettant de limiter les coûts (financiers, temps, énergie) pour l'identification et la compréhension des phénomènes catalytiques. Les acylases, contrairement aux lipases, ont été beaucoup moins décrites pour la réaction d'acylation d'acides aminés. Lors d'un travail antérieur (Ferrari 2014), des aminoacylases provenant du surnageant de culture de *Streptomyces ambofaciens*, espèce sélectionnée parmi plusieurs *Streptomyces*, ont été découvertes au sein du laboratoire. Ces dernières avaient montré de très intéressantes activités d'acylation de la lysine et de certains

## Introduction générale

peptides avec une régiosélectivité vis-à-vis de la fonction amine en position  $\alpha$ . Cependant, les performances de ces enzymes pour la N-acylation d'acides aminés, autres que la lysine, n'ont jamais été étudiées. L'objectif de cette étude a été également d'étudier ces enzymes en termes de chimio et de régio-sélectivité. Pour cela, plusieurs accepteurs d'acyles dont les 22 acides aminés protéinogéniques et plusieurs donneurs d'acyles de différentes longueurs de chaîne et propriétés ont été utilisés. La comparaison de la spécificité de substrat entre l'extrait brut issu de la souche sauvage de *S. ambofaciens* et l'extrait brut issu d'une souche mutante exprimant uniquement certaines aminoacylases d'intérêt a également été réalisée, pour mieux comprendre la chimio et la régiosélectivité des différentes aminoacylases.

La faible stabilité d'un biocatalyseur libre ainsi que sa non recyclabilité peuvent être des verrous pour l'extrapolation du procédé à l'échelle industrielle. Afin de remédier à cela, plusieurs techniques d'immobilisation peuvent être utilisées. C'est pourquoi les objectifs de la deuxième partie de cette thèse concernent l'évaluation des performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* immobilisées sur différents supports en milieu aqueux.

Afin d'atteindre ces objectifs, plusieurs supports d'immobilisation ont été développés en collaboration avec les partenaires du projet ANR ISEAPIM3 qui sont le Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP) de Bordeaux et le Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM) de Nancy. Des supports mésoporeux, méso-macroporeux et macroporeux à base de silice ont été développés permettant l'immobilisation des enzymes soit par adsorption (physisorption) ou par des liaisons covalentes (chimisorption) avant d'étudier les performances de ces enzymes dans les milieux adaptés à chaque enzyme.

Enfin, dans la troisième partie de cette thèse, le procédé enzymatique identifié comme étant le plus adapté à la production d'acides aminés acylés a été intensifié pour la production d'un acyl-acide aminé particulier à fort intérêt industriel. Ce dernier a été purifié et son activité biologique a été évaluée et comparée à celle de la molécule commerciale, synthétisée par voie chimique.



# CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---





# 1 Chapitre I : Étude bibliographique

## 1.1 Acylation d'acides aminés

### 1.1.1 Les acides aminés acylés

Les tensioactifs font partie des produits chimiques les plus utilisés au monde. Selon Acmite Market Intelligence 2016, une croissance continue du marché mondial des agents de surface a été enregistrée, avec des prévisions de croissance de 4,4% entre 2015 et 2024 et une augmentation des volumes de 3,9% au cours de la même période, passant de 16,35 millions de tonnes à 22,97 millions de tonnes (Acmite Market Intelligence, 2016). En raison de leur diversité structurale et de leurs propriétés (anioniques, cationiques, amphotères et non ioniques), les tensioactifs ont trouvé une large gamme d'applications dans les industries cosmétiques, des détergents et autres. Cette augmentation importante de la demande s'accompagne d'un accroissement de la production de tensioactifs, en particulier ceux dérivés de composés pétrochimiques peu respectueux de l'environnement. De nos jours, une forte demande des consommateurs et des autorités réglementaires est observée afin de remplacer, du moins en partie, les surfactants à base pétrochimique par des surfactants moins toxiques et issus de ressources renouvelables produites par des technologies durables (Marchant, Banat, 2012). En effet, ce groupe de surfactants regroupe ceux obtenus par fermentation (biosurfactant) et ceux synthétisés à partir de matières premières renouvelables (surfactants biosourcés ou naturels). Les surfactants à base d'acides aminés (SAA) provenant de la condensation d'un acide aminé et d'une ou de plusieurs longues chaînes apolaires telles que les acides gras constituent l'une des classes les plus importantes de molécules tensioactives naturelles (Infante et al., 2010). Cela permet d'obtenir une molécule avec des propriétés de surface élevées et, dans certains cas, d'acquérir une activité biologique et une résistance plus importante aux contraintes physicochimiques faisant de ces surfactants des molécules de choix pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Gleeson et al., 2015 ; Rondel et al., 2009).

### **Classification et utilisation des surfactants à base d'acide aminé :**

L'étude des AAS pour les applications industrielles a commencé en 1909 avec l'étude de Bondi et la synthèse de la N-acylglycine et de la N-acylalanine. Cependant, ce n'est qu'en 1936 que Hentrich et al. ont déposé le premier brevet sur l'application des AAS dans des produits de nettoyage ménagers tels que les détergents, les shampooings et les dentifrices (Hentrich et al., 1936). Étant donné la diversité structurale des 22 acides aminés naturels qui se trouvent dans la partie radicalaire de la molécule, un grand nombre de surfactants aux propriétés et activités

diverses peuvent être synthétisés. En effet, selon le radical de l'acide aminé et le groupement acylé : O-acylation avec le groupement hydroxyle, N-acylation avec le groupement amine, S-acylation avec le groupement thiol, les AAS peuvent être classés sur la base du type du groupement fonctionnel libre en bout de chaîne avec des applications industrielles différentes (Tripathy et al., 2018 ; Yea et al., 2018a ; Le Guenic et al., 2019):

- Les AAS cationiques : ce sont des AAS qui possèdent une charge positive libre sur leur partie hydrophile. Ils contiennent en général de la lysine ou de l'arginine. Ils peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens ou agents antistatiques comme l'ester éthylique de cocoyl arginine utilisé comme désinfectants. Ils sont aussi utilisés dans des textiles comme adoucissant et additif antistatique.
- Les AAS anioniques : ce sont des AAS qui possèdent une charge négative libre sur leur partie hydrophile. Deux exemples sont le N-cocoyl-L-glutamate et le N-cocoyl glycinate de potassium utilisé en cosmétique et dans des produits d'entretien.
- Les AAS non ioniques : ce sont des AAS qui ne possèdent pas de charge. Ils sont utilisés pour leur pouvoir de détergence et leurs propriétés moussantes (ex : dérivés de phénylalanine et de leucine). L'absence de charge les rend peu influencés par la présence d'ions calcium et magnésium dans les eaux dures. Cela permet leur utilisation comme agent de surface dans les domaines de la cosmétique, du textile, de la papeterie et des agroproduits,
- Les AAS zwitterioniques ou amphotères : ce sont des AAS qui possèdent des fonctions cationiques et anioniques comme l' $\epsilon$ -lauroyl-lysine, largement utilisée dans les crèmes et les revitalisants capillaires en raison de sa faible solubilité en milieu aqueux.

Une autre classification de ces molécules se base sur le nombre de chaînes hydrophobes acylées sur l'acide aminé (figure 1.1). On y trouve :

- les AAS **linéaires** : ils sont le résultat de l'acylation d'un acide aminé par un seul acide gras. C'est la forme la plus retrouvée naturellement qui englobe les AAS décrits précédemment,
- les AAS dimériques appelés aussi **gemini** : ils proviennent de l'association de deux AAS linéaires à l'aide d'un espaceur de longueur de chaîne variable,
- les AAS de type **glycérolipides** : cette classe englobe les mono- et di-acyl-glycérol à base d'acides aminés tels que l'arginine pour la production d'AAS cationiques,

- Les AAS **bolaamphiphiles** : ils proviennent de la condensation de deux acides aminés avec une seule chaîne hydrophobe contenant deux sites réactifs (acides gras dicarboxyliques tels que l'acide succinique et azélaïque),

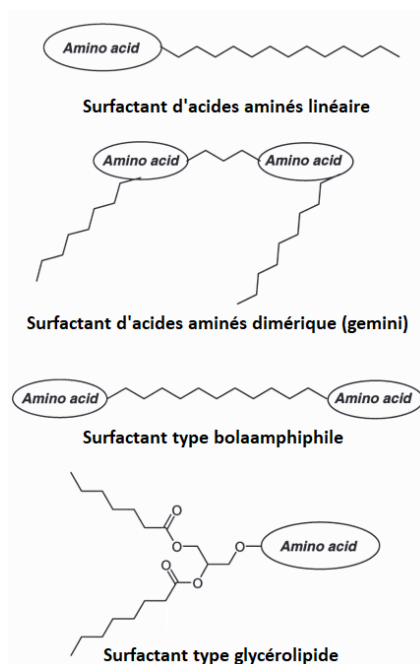


Figure 1.1 : structure des surfactants à base d'acides aminés

### 1.1.2 Activités biologiques des surfactants à base d'acides aminés

Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'identifier et de caractériser l'activité des acides aminés acylés dans les matrices biologiques (annexe 1). Tous les acides aminés protéinogéniques N-acylés ont été identifiés dans les organismes vivants en particulier les mammifères (Farrell, Merkler, 2008). Ces derniers interviennent comme des molécules à l'état de trace dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques. L'acide aminé qui rentre dans la composition des acides aminés acylés le plus répandu dans les matrices biologiques est la glycine. Elle intervient, ainsi que la taurine, dans la formation de la bile à partir de l'acide biliaire permettant ainsi la solubilisation de ce dernier afin de protéger le foie de l'action agressive de l'acide initial. Cela explique pourquoi 98% de l'acide biliaire est transformé. De plus, ces acides aminés acylés présentent un caractère hydrophobe et des propriétés de surface très importantes permettant une solubilisation et une meilleure absorption intestinale des lipides et des vitamines (Trottier et al., 2006). Les AAS à base de glycine tels que le N-oléoyl ou l'arachidonoyl-glycine jouent aussi le rôle de molécule signal intervenant dans la thermorégulation du corps et la locomotion (Chaturvedi et al., 2006). L'arachidonoyl-glycine a aussi été identifiée dans le cerveau comme un analgésique. Ce dernier intervient dans la réduction de la douleur en supprimant

l'hyperactivité induite par la formaline dans les voies nociceptives en agissant soit directement sur le nerf ou indirectement en modulant leur environnement interstitiel immédiat (Huang et al., 2001). Il joue aussi le rôle d'anti-inflammatoire en agissant comme molécule signal (Takenouchi et al., 2012). D'autres AAS présentent la même activité mais le mécanisme n'a pas été décrit. Le N-acétyl-glutamate est aussi un AAS très important dans la régulation des fonctions urinaires. Il joue le rôle d'un activateur allostérique obligatoire de la carbamyl phosphate synthétase I qui intervient dans l'uréogénèse (Caldovic et al., 2006). Le N-arachidonoyl-L-sérine a aussi été décrit comme ayant des propriétés vasodilatatrices et pro-angiogéniques, en activant les protéines intervenant dans la voie de signalisation conduisant à cet effet biologique (Milman et al., 2006). Il a montré d'excellentes propriétés pro-neurogènes et neuro-protectrices dans le cas de lésion cérébrale (Cohen-Yeshurun et al., 2013). Ces études, entre autres, démontrent l'intérêt et les possibilités d'utilisation des AAS comme actifs dans les produits pharmaceutiques en plus de leur possible utilisation comme molécules cibles dans le diagnostic de certaines maladies (Goldstein, 1963 ; Loots et al., 2005).

A part les AAS endogènes à l'organisme, certains AAS produits par des microorganismes ou par voie chimique présentent aussi des activités biologiques très attractives pour des applications industrielles. Les AAS chargés positivement tels que les acyl-lysine et acyl-arginine ont été largement décrits dans la littérature comme ayant d'importantes activités antimicrobiennes. La présence du  $\text{NH}_3^+$  libre provoque une dépolarisation et une perturbation de la membrane des microorganismes causant la destruction des cellules (Pinazo et al., 2016). Le N-10-undécénoyl-L-phénylalanine a été décrit comme étant capable de réduire l'hyperpigmentation de la peau en association avec la niacinamide. Cet AAS joue le rôle d'une molécule antagoniste au récepteur de l'hormone de stimulation de l' $\alpha$ -mélanocyte réduisant ainsi la production de mélanine par les mélanocytes (Bissett et al., 2009a). D'autres AAS présentant des activités très variables sur la peau et les cellules adipocytaires (activités antirides, antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antistress) sont actuellement produits et commercialisés par plusieurs sociétés industrielles. Toutes ces activités biologiques font de ces AAS des molécules très attractives pour des utilisations dans la formulation de produits cosmétiques et de produits d'entretien. Par ailleurs, il est à noter que leur utilisation doit aussi être régulée à cause de possibles effets secondaires de ces molécules tels que l'irritation de la peau. C'est l'exemple du capryloylglycine utilisé pour le traitement de l'acné (Mangodt et al., 2019).

### 1.1.3 Caractéristiques structurales des AAS et paramètres influençant leur efficacité

L'utilisation des AAS dans les produits cosmétiques est conditionnée par leur efficacité et leur stabilité. L'objectif lors du développement de telles molécules est de trouver les paramètres permettant d'améliorer leurs propriétés physicochimiques et leur efficacité afin de réduire la quantité utilisée dans la formulation, diminuant ainsi l'impact environnemental (consommation moins importante de matière et d'énergie). Greber et al., 2017 ont étudié l'influence du nombre de charges positives et de la longueur de la chaîne aliphatique sur l'activité antimicrobienne de surfactants à base de lysine. Ils ont démontré que l'activité biologique était étroitement liée à la longueur de la chaîne grasse où la réduction du nombre de carbone a conduit à une diminution de l'activité avec de meilleures activités en présence de l'acide palmitique (C16). D'autre part, le nombre de charges positives influence aussi l'efficacité des AAS où un minimum de deux charges positives est nécessaire pour améliorer l'activité (Greber et al., 2017a). Par contre, les propriétés de surface de ces molécules sont négativement affectées par l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse et du nombre de charges, ce qui limite leur utilisation comme agents de surface (Greber, 2017b). Shi et al., 2019 ont évalué les propriétés de surface de la lysine acylée avec des acides gras de différentes longueurs de chaîne. La détermination de la concentration micellaire critique (CMC) et des paramètres liés aux propriétés de surface a montré une meilleure efficacité en présence d'acide laurique (C12) que celles obtenues avec des acides gras de plus courtes chaînes (C8 et C10). Cela permet la formation d'émulsions avec des gouttelettes de plus faible diamètre et donc d'envisager leur utilisation dans le domaine pharmaceutique et cosmétique (Shi et al., 2019).

En plus de la longueur de la chaîne grasse, la présence ou l'absence d'insaturation peut aussi jouer un rôle sur les propriétés des AAS. Joondan et al., 2017 ont étudié l'influence de la tyrosine acylée par différents acides gras sur les propriétés de surface et l'activité antimicrobienne. Les résultats ont montré une diminution de la valeur de CMC avec l'augmentation de la longueur de la chaîne aliphatique traduisant de meilleures propriétés de surface, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec la lysine par Shi et al., 2019. Par ailleurs, la présence d'une double liaison, pour la même longueur de chaîne, a engendré une augmentation de la CMC. D'autre part, l'activité antimicrobienne la plus élevée a été obtenue en présence de C12 comme acide gras saturé. La présence d'insaturation a permis une amélioration de 5 à 10 fois de l'activité antimicrobienne pour le même acide gras (Joondan et al., 2017).

L'acide aminé utilisé joue aussi un rôle dans les propriétés de surface des AAS produits. Brito et al., 2009 ont étudié les propriétés de différents acides aminés (tyrosine, sérine, hydroxyproline et lysine) acylés avec de l'acide laurique. Selon leur étude, les meilleures propriétés de surface ont été obtenues en présence de lysine comme acide aminé comparé à ceux des surfactants conventionnels (dodécyltriméthylammonium bromide ou DTAB) (Brito et al., 2009).

Parmi les acides aminés, la lysine représente un cas particulier lié à la présence d'un  $\text{NH}_2$  réactif au bout de la chaîne latérale qui permet la formation de liaison amide en position  $\epsilon$  en plus de la position  $\alpha$ . La position de N-acylation dans ce cas joue un rôle important dans la propriété et l'activité de l'AAS synthétisé. Pérez et al. ont étudié l'influence du groupe N-acylé de l'ester méthylique et éthylique de la lysine sur l'activité antimicrobienne. Ils ont démontré que l'acylation en position  $\epsilon$  diminuait considérablement l'activité antimicrobienne par rapport à la lysine acylée en position  $\alpha$  en raison de la différence importante entre les deux pKa de la fonction amine (8,8 pour l' $\epsilon$ -lauroyl-lysine et 6,2 pour l' $\alpha$ -lauroyl-lysine) (Pérez et al., 2009 ; Pinazo et al., 2016).

### 1.1.4 Toxicité et biodégradabilité des AAS

L'intérêt principal de la production et de l'utilisation des AAS est leur faible impact environnemental et sanitaire. La toxicité et la biodégradabilité des AAS sont donc très importantes. En général, la toxicité d'un surfactant est liée à ses propriétés de surface qui vont perturber la membrane cellulaire via un positionnement à l'interface cellule/eau. La toxicité est étroitement liée à la longueur de la chaîne aliphatique car plus la longueur de la chaîne est augmentée plus la CMC est réduite et donc la tension de surface est accrue (Tripathy et al., 2018). L'écotoxicité des AAS a été largement décrite dans la littérature. Infante et al., (2010) ont comparé la toxicité de plusieurs catégories d'AAS cationiques (linéaires, gémini et glycérolipides) à base de lysine et d'arginine en utilisant *Daphnia magna* comme espèce aquatique cible. Toutes les valeurs obtenues ont indiqué que ces AAS ont une toxicité inférieure à l'hexadécyltriméthyl-ammonium bromide (HTAB) pris comme référence (Infante et al., 2010). Brito et al., 2009 ont aussi étudié la toxicité aquatique de la tyrosine, la sérine et la lysine acylées en utilisant la même espèce. La toxicité de tous ces AAS était inférieure à celle du HTAB pris comme référence. L'association de DTAB avec un acyl-lysine a par ailleurs permis de réduire son écotoxicité (Brito et al., 2009).

## Chapitre I : Étude bibliographique

L'évaluation de l'activité hémolytique est aussi un paramètre très important lors du développement des AAS pour des applications pharmaceutiques et cosmétiques. Nogueira et al., 2011 ont étudié l'activité hémolytique de surfactants à base de lysine en modifiant le contre-ion utilisé et le pH lors des essais. Les résultats ont montré que tous les AAS présentent une activité hémolytique mais cette dernière est de 4 à 17 fois inférieure à celle obtenue avec le sodium-dodécyl-sulfate (SDS) avec la plus faible activité en présence du Tris comme contre-ion. Ils ont aussi démontré l'influence négative de la réduction du pH du milieu (Nogueira et al., 2011). Pérez et al., 2009 ont comparé l'activité hémolytique des AAS à base de lysine méthyl-ester acylé en position  $\alpha$  et  $\epsilon$  et en changeant la longueur de la chaîne d'acide gras. L'activité hémolytique de la lysine acylée en position  $\alpha$  était plus de six fois plus importante à celle observée via l'acylation en position  $\epsilon$ . Cela peut être lié à la nature de la charge positive de l'AAS qui s'adsorbe à la surface cellulaire (érythrocytes), par interaction avec les molécules chargées négativement présentes sur la membrane, ce qui augmente la perméabilité membranaire causant ainsi une lyse cellulaire. L'augmentation de la longueur de la chaîne de l'acide gras a permis de réduire l'activité hémolytique de l'AAS (Pérez et al., 2009). A l'inverse de ces auteurs, d'autres études ont montré une augmentation de l'effet hémolytique avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse en utilisant de l'histidine comme acide aminé. Ils ont expliqué ces résultats par l'augmentation de l'accessibilité des AAS dans la bicouche lipidique (Pinazo et al., 2019).

La biodégradabilité d'un composé est définie comme la possible décomposition chimique par les organismes vivants du sol d'une molécule en molécules plus simplement assimilables. C'est un paramètre très important afin de revendiquer l'éco-compatibilité d'une molécule. Les AAS sont reconnus comme étant des molécules biodégradables. En effet, étant donné qu'ils sont issus de la condensation d'un acide aminé (ou peptide) et d'une chaîne aliphatique par une liaison ester ou amide, ces derniers sont facilement clivés par l'action d'enzymes naturellement présentes dans les organismes vivants. Certains auteurs se sont intéressés à l'évaluation du caractère biodégradable de différentes catégories d'AAS à base d'arginine. Selon ces auteurs, une bonne biodégradabilité de ces AAS a été obtenue après quelques jours avec 90% de l'AAS linéaire, 87% de l'AAS dimérique et 79% de l'AAS de type glycérolipidique (Pérez et al., 2005 ; Infante et al., 2010). Shahzadi et al., 2019 ont simulé la biodégradation d'AAS à base d'arginine avec différentes longueurs de chaînes aliphatiques par les enzymes digestives dans la perspective de leur utilisation en industrie pharmaceutique. Ils ont démontré que la quasi-totalité des AAS était dégradée après 48h sauf dans le cas d'utilisation d'AAS à longue chaîne

aliphatique et à haute concentration où 50% du produit a été dégradé (Shahzadi et al., 2019). Les AAS à base de glycine ont aussi été décrits par plusieurs auteurs comme ayant une très bonne biodégradabilité (Zhang et al., 2016 ; Yea et al., 2018b).

### 1.1.5 Synthèse *in vivo* de surfactants à base d'acides aminés

La synthèse de surfactants à base d'acides aminés est réalisée par la condensation d'une chaîne aliphatique sur un des groupements fonctionnels libre d'un acide aminé. On parle de N-acylation ou amidation quand l'acylation d'un acide aminé, par le transfert d'un groupe acyle à partir d'un acide gras, se fait sur une fonction amine libre permettant la formation d'une liaison amide. Cette liaison amide présente une meilleure stabilité que les liaisons esters (Infante et al., 2010).

La voie de biosynthèse des AAS *in-vivo* a été étudiée par plusieurs auteurs. Elle se fait en général par la condensation d'un acyl-CoA et d'un acide aminé permettant de synthétiser un N-acyl-acide aminé et la libération d'un CoA-SH par intervention d'une ou plusieurs enzymes. Plusieurs enzymes ont été décrites comme étant impliquées dans l'acylation des acides aminés *in-vivo* :

- la N-Acetyl-glutamate synthase (NAGS, EC 2.3.1.1) : c'est une enzyme mitochondriale qui catalyse la réaction de synthèse du N-acétyl-glutamate (NAG) à partir du glutamate et de l'acétylcoenzyme A (Caldovic et al., 2006),
- l'acide biliaire et l'acyl-CoA acide aminé N-transférase : c'est une enzyme du foie qui permet la condensation de l'acide biliaire avec la glycine et la taurine (Falany et al., 1994 ; Kelley, Vessey, 1994),
- L'acyl-CoA : L-glutamine N-acyltransférase: c'est un enzyme mitochondriale qui catalyse la réaction d'acylation de la glutamine avec le phenylacetyl-CoA ou indoleacetyl-CoA (Webster et al., 1976).
- La N-myristoyltransférase (NMT, EC 2.3.1.97) : elle permet l'ajout d'un acide myristique à une glycine terminale d'une protéine (Raju et al., 2000),
- Le Cytochrome c : il permet la condensation de l'oléoyl-CoA et l'arachidonoyl-CoA avec la glycine en présence de peroxyde d'hydrogène (Mueller, Driscoll, 2007 ; McCue et al., 2008),

Ces voies de synthèse sont très importantes pour la compréhension de la provenance des acides aminés acylés impliqués dans les différentes activités biologique *in-vivo*. Par ailleurs, il est très difficile de reproduire ce genre de réaction dans une perspective de production industrielle d'AAS. De plus, les enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces molécules présentent une



chimiosélectivité importante. C'est pourquoi plusieurs procédés chimiques ont été développés pour la production à grande échelle.

### 1.1.6 Synthèse *in vitro* de surfactants à base d'acides aminés

#### 1.1.6.1 Acylation des acides aminés par voie chimique

La voie chimique d'acylation des acides aminés ou peptides (N-acylation ou O-acylation) la plus utilisée à l'échelle industrielle fait appel à la réaction de Schotten-Baumann. Dans ce cas, une réaction est réalisée entre une molécule contenant un groupement amine ou hydroxyle libre avec un chlorure d'acyle en milieu aqueux (Figure 1.2). Cela conduit à la libération d'un proton d'où la nécessité d'ajouter le donneur d'acyle graduellement (goutte à goutte) et de maintenir le pH du milieu réactionnel à des valeurs très élevées (pH 10) par l'utilisation de soude ou de carbonate de sodium. L'arrêt de la réaction se fait en général par l'acidification du milieu par ajout d'une solution diluée d'acide sulfurique qui permet aussi la précipitation du produit et des composés résiduels (chlorure d'acyle et acide aminé). La diminution importante du pH durant la réaction et le manque de maîtrise du procédé (ratio accepteur d'acyle/donneur d'acyle) peut conduire à un changement de l'équilibre thermodynamique au profit de la réaction d'hydrolyse pouvant aboutir à la présence d'acide gras résiduel dans le milieu réactionnel. A la fin de la réaction, l'importante quantité de sel produite lors de la réaction ainsi que les substrats résiduels, acide aminé et chlorure d'acyle, sont éliminés par filtration et lavage. Malgré la quantité importante d'effluents générée à la fin de la réaction, qui nécessite un retraitement en bassin, cette réaction permet d'avoir un rendement d'acylation très élevé (entre 75 et >90%) d'où sa large utilisation à l'échelle industrielle. D'autre part, un autre inconvénient important de cette réaction est qu'elle n'est ni régio- ni chimio-sélective ce qui nécessite une étape de protection/déprotection dans le cas des acides aminés contenant un ou plusieurs groupements fonctionnels conduisant à des coûts de production plus importants (Joondan et al., 2018).

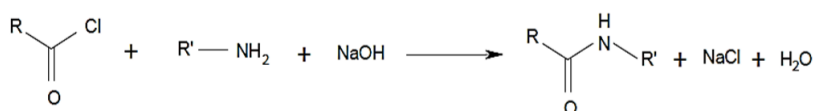


Figure 1.2 : réaction chimique (Schotten-Baumann) d'acylation d'une fonction amine

Afin d'éviter les étapes de protection/déprotection par le greffage de groupement sur la partie à protéger, certains auteurs ont réalisé une cyclisation de l'acide aminé (lysine) par chauffage dans du n-hexyl alcool pour obtenir de l' $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactam (figure 1.3). Ce dernier est mis en réaction avec de l'acyl-chlorure dans de l'eau en présence de dichlorométhane et du

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  puis une réouverture du cycle est réalisée par hydrolyse en conditions alcalines (Shi et al., 2019).

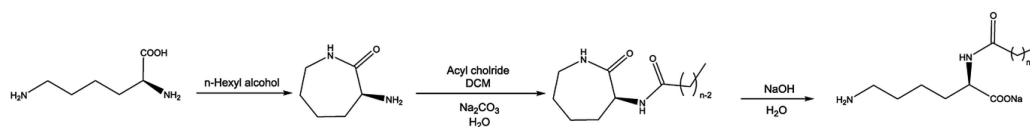


Figure 1.3 : procédure de synthèse de l' $\alpha$ -acyl-lysine (Shi et al., 2019)

A part la réaction de Schotten-Baumann, l'acylation chimique peut se faire en milieu organique. Joondan et al., 2017 ont réalisé la réaction de N-acylation de l'ester de tyrosine avec plusieurs chlorures d'acyle dans un mélange de tétrahydrofurane et de la triméthylamine en présence du 4-diméthylaminopyridine. Des rendements de conversion proches de 70% ont été obtenus après 18h de chauffage sous reflux (Joondan et al., 2017). Par ailleurs, ces méthodes nécessitent une ou plusieurs étapes de purification afin de récupérer le produit. De plus, la production de chlorure d'acyle nécessite le mélange de l'acide gras avec de l'oxalyl chloride qui est dangereux pour le manipulateur et l'environnement (toxique, inflammable, irritant) (Sreenu et al., 2015)

La méthode de synthèse en phase-solide est une méthode utilisée pour la production de peptide par greffage des acides aminés sur une résine ce qui facilite la récupération du produit par clivage de la liaison avec le support. Certains auteurs l'ont utilisé pour l'acylation d'acide aminé (lysine) et peptides (poly-lysine) avec des acides gras (pas d'utilisation de chlorure d'acyle). Dans ce cas, la lysine dont la partie epsilon est protégée avec du tert-butyloxycarbonyl (Boc) et du 9-fluorenyl-méthoxycarbonyl (Fmoc) en position  $\alpha$  est fixée par son groupement carboxylique sur la résine. Le groupement Fmoc est ensuite enlevé avec une solution de pipéridine dans du N,N-diméthylformamide (DMF) libérant le groupement amine. La formation de la liaison amide est réalisée en présence de l'acide gras dans un mélange de DMF, dichlorométhane (DCM), diisopropylcarbodiimide (DIC) et du 1-hydroxybenzotriazole (HOBt). Enfin, l'AAS est libéré avec un mélange de trifluoroacétate (TFA), de triisopropylsilane (TIS) et de l'eau. Le rendement de la synthèse dans ce cas est supérieur à 80% (Greber, 2017b).

En résumé, les voies chimiques de synthèse des AAS présentent des rendements de conversion très élevés, en particulier par l'utilisation de la réaction de Schotten-Baumann, mais l'impact environnemental et sanitaire du procédé reste un problème majeur. En effet, tous ces procédés chimiques utilisent soit un substrat activé et/ou un ou des solvant(s) organique(s) que l'on peut retrouver dans les effluents en plus des sels chlorés générés, nécessitant un traitement post-production. De plus, l'absence de sélectivité de ces procédés impose l'ajout d'étapes

supplémentaires afin d'orienter la réaction. Tout cela augmente le coût de production industrielle des AAS (mais aussi des peptides acylés). Ces dernières années, des groupes industriels soutenus par des organismes étatiques visent à développer des technologies durables permettant de passer de la dépollution en bout de chaîne à une stratégie de réduction de génération de déchets durant le procédé de production lui-même. Cela permet non seulement de réduire l'impact environnemental lié à la production, mais aussi de promouvoir la compétitivité économique en utilisant au mieux les matières premières (Sheldon, Woodley, 2018a). L'une des voies de développement la plus attractive afin d'atteindre ces objectifs est la bioconversion enzymatique.

### 1.1.6.2 Acylation des acides aminés par voie enzymatique

L'utilisation des enzymes comme catalyseurs pour les réactions d'acylation attire de plus en plus l'attention des industriels. Ces biocatalyseurs sont produits par une très grande variété d'organismes vivants (microorganismes, champignons, levures, plantes, animaux, ...) dans des conditions vertes, sans génération de molécules toxiques. Ils peuvent catalyser les réactions d'hydrolyse ou de synthèse dans des conditions de pression et température modérées, en général dans de l'eau, sans nécessité absolue de substrats activés. De plus, ces catalyseurs ont des régio-, énantio- et chimio-sélectivité propres à chaque enzyme dans des conditions données permettant d'éviter les étapes de protection / déprotection des groupements non ciblés réduisant le nombre d'étapes de production et le coût du procédé. Ces avantages environnementaux et économiques permettent de classer ce genre de voie de production dans les procédés respectant les principes de la chimie verte (Sheldon, 2012).

L'utilisation des enzymes pour les réactions d'acylation (amidation ou estérification) a été largement décrite dans la littérature dans une perspective de production de molécules pour la cosmétique, de synthons pour l'industrie pharmaceutique ainsi que d'autres biomolécules à intérêt industriel (Pitzer, Steiner, 2016 ; Dorr, Fuerst, 2018 ; Manova et al., 2018 ; Contente et al., 2018 ; Lima et al., 2019 ; Mestrom et al., 2019 ; Perdomo et al., 2019). Par ailleurs, l'acylation enzymatique des acides aminés, en particulier la N-acylation, a été très peu décrite par rapport aux autres types de molécules malgré son intérêt industriel indéniable. Dans un but de développement de procédé enzymatique durable, le choix adapté du couple enzyme/milieu réactionnel et l'étude des conditions expérimentales (concentration de substrat, température, pH, force ionique, immobilisation ou non de l'enzyme ...) sont des éléments cruciaux afin de bien contrôler la réaction. Ce choix permet d'une part d'augmenter l'efficacité de la synthèse

mais aussi d'orienter la régio- et la chimio-sélectivité selon l'objectif visé. Plusieurs enzymes décrites dans la littérature seront présentées ultérieurement.

### 1.1.6.3 Acylation des acides aminés par voie chimio-enzymatique

Etant donné que la réaction d'acylation enzymatique est conditionnée par une certaine compatibilité enzyme/substrat et la nécessité d'un bon contact entre les deux, plusieurs auteurs ont proposé l'association des deux voies de synthèse afin de moduler et d'améliorer la synthèse d'AAS. En effet, la faible solubilité des acides aminés dans les solvants organiques utilisés pour orienter l'équilibre thermodynamique de la réaction, lors de l'utilisation de lipases en particulier, peut être un frein au bon transfert du substrat vers le site actif, engendrant ainsi de faibles taux de conversion (Montet et al., 1990 ; Villeneuve, 2007). Afin d'augmenter la solubilité des substrats, plusieurs auteurs ont utilisé des acides aminés sur lesquels des groupements méthyl, éthyl, tert butyl ou carbobenzyloxy (Cbz) ont été greffés afin de protéger les groupements non concernés par l'acylation (Valivety et al., 1997 ; Izumi et al., 1997 ; Goujard et al., 2004). Cependant, cela nécessite une étape supplémentaire d'hydrolyse chimique pour la libération du groupement protecteur. Goujard et al., 2004 ont utilisé la voie chimio-enzymatique pour la synthèse de N-arachidonoyl glycine en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* comme enzyme. Ils ont comparé les performances de l'enzyme en présence de la glycine et de la glycine tert-butyl ester comme accepteur d'acyle et de l'acide arachidonique et du méthyl-arachidonoate comme donneur d'acyle. L'utilisation de la glycine tert-butyl ester a permis d'augmenter le taux de conversion de 5,7 à 52 % en présence de l'acide arachidonique et de 10 à 75 % en présence du méthyl-arachidonoate après 24h de réaction. Le tert-butyle est ensuite libéré dans une solution de dichlorométhane et d'acide trifluoroacétique (Goujard et al., 2004). L'augmentation du taux de conversion après ajout du groupement alkyl peut être aussi expliquée par l'amélioration de l'accessibilité et de l'interaction du substrat avec le site actif, augmentant ainsi la réactivité de l'enzyme (Dettori, 2017). Valivety et al., (1997) ont utilisé la même voie pour la synthèse de dérivés de la serine. Ces derniers ont utilisé la sérine et la lysine ainsi que leurs dérivés methyl / ethyl ester et amide et Cbz amide comme accepteur d'acyle et de l'acide myristique et son dérivé méthyl-ester comme donneur d'acyle dans des conditions sans solvant. L'utilisation du N-Cbz-L-sérine a permis d'avoir un taux de O-acylation de 92% contrairement aux autres substrats où le taux de conversion ne dépasse pas les 10% (Valivety et al., 1997).

L'utilisation de la voie chimio-enzymatique a aussi été mise en œuvre pour la synthèse d'AAS de type gemini et bolaamphiphile nécessitant la protection et déprotection du groupement

fonctionnel non concerné par l'acylation (Clapés, Infante, 2002). Piera et al., 2000 ont mis en place une procédure de synthèse d'AAS de type gémini à base d'arginine. Pour cela, ils ont utilisé du N- $\alpha$ -lauroyl-L-arginine éthyl ester monohydrochloride comme unité de base, du 1,3 diaminoalkane comme espaceur et la papaïne comme enzyme. Afin d'éviter l'inhibition de l'enzyme par le diamine de l'espaceur, une étape chimique a été réalisée pour fixer la première unité avec l'espaceur puis une deuxième étape, enzymatique, permettant de relier la deuxième unité et former le produit final (Piera et al., 2000).

Cette voie de synthèse est très attractive pour améliorer les performances d'un procédé en faisant face aux problèmes de solubilité des substrats et en modulant et contrôlant la réactivité de l'enzyme. Cependant, cela présente un coût additionnel étant donné la nécessité de passer par deux étapes supplémentaires de protection/déprotection.

### 1.2 Réaction d'acylation enzymatique en milieu non aqueux

#### 1.2.1 Enzymes catalysant la réaction d'acylation en milieu non aqueux

Les hydrolases (amylases, protéases, lipases, ...) constituent les enzymes les plus utilisées à l'échelle industrielle en raison de leur disponibilité, de leur faible coût, de leur spécificité de substrat et de leurs propriétés de régio-, énatio- et stéréo-sélectivité. Parmi ces dernières les lipases ou triacylglycérol acyl hydrolases (EC 3.1.1.3) sont les plus représentées, la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) étant la plus utilisée industriellement. Elles sont extraites de différentes sources (microbiennes, végétales, animales, aquatiques, ou terrestres, ...) et utilisées dans différents domaines : traitement de déchets, production de détergents, d'ingrédients cosmétiques et alimentaires, d'actifs pharmaceutiques sans oublier dans le domaine de l'énergie avec la production de biodiesel (Javed et al., 2018 ; Filho et al., 2019).

Elles appartiennent à la famille des  $\alpha,\beta$ -hydrolases qui ont une structure commune constituée de 8 feuillets  $\beta$  connectés par 6 hélices  $\alpha$  avec un site actif formé d'une triade catalytique composé d'un résidu nucléophile (sérine), d'un résidu catalytique acide (acide aspartique ou acide glutamique) qui forme une liaison hydrogène avec un histidine (Holmquist, 2000 ; Bordes et al., 2010 ; Schreck, Grunden, 2014). Elles sont capables de catalyser la réaction d'hydrolyse d'esters carboxyliques (triglycérides, ...) en glycérol, ou mono- et di-glycérides, et acide gras en milieux aqueux et à l'interface eau/substrat hydrophobe insoluble (émulsion) une fois que la concentration micellaire critique est atteinte ; on parle alors du phénomène d'activation interfaciale. Ce phénomène se traduit par une augmentation très importante de l'activité lipolytique lorsqu'une certaine concentration de substrat est atteinte, ce qui les différencie des estérases qui ne présentent pas d'activation interfaciale (Verger, de Haas, 1976 ;

## Chapitre I : Étude bibliographique

Sarda, 2009). Ce phénomène est étroitement lié à la structure des lipases, en particulier à la présence d'un volet moléculaire amphiphile ou lid, formé du repliement d'une hélice  $\alpha$ , qui couvre l'entrée de la cavité du site actif (Brady et al., 1990 ; Kohno et al., 1996). Ce phénomène ne concerne cependant pas toutes les lipases. En effet, CALB ne présente pas de phénomène d'activation interfaciale, principalement en raison de l'absence de lid qui régule l'accessibilité au site actif (Uppenberg et al., 1995). Stauch et al. (2015) ont réalisé une cristallographie de la structure de CALB à une résolution de 0,91 Å permettant de mettre en évidence la relation entre l'état de protonation des résidus Asp145 et Lys290 et la conformation ouverte et fermée du site actif par un changement conformationnel de l'enzyme. Cette étude a permis d'expliquer l'absence d'activation interfaciale efficace chez CALB (Stauch et al., 2015).

Les lipases ont été décrites dans la littérature comme étant capables de catalyser plusieurs types de réactions avec une large gamme de substrats sans utilisation de coenzyme. En effet, le contrôle des conditions opératoires, en particulier la réduction de l'activité de l'eau libre ( $a_w$ ) du milieu réactionnel, engendre un changement de l'équilibre thermodynamique de la réaction vers la réaction de synthèse. Afin que cette réaction soit faisable, des solvants non aqueux tels que les solvants organiques, le CO<sub>2</sub> supercritique (scCO<sub>2</sub>), les milieux fondus (milieux sans solvant avec acide gras en large excès) et les solvants néotériques (liquides ioniques et solvants eutectiques) sont utilisés. Cette particularité des lipases a été décrite pour la première fois par Zaks et Klivanov (1985) ce qui a permis d'étendre leurs utilisations pour d'autres types de réactions et applications industrielles plus attractives (tableau 1.1) (Zaks, Klivanov, 1985 ; Fukui, Tanaka, 1985 ; Zaks, Russell, 1988). Parmi ces lipases, CALB fait partie des enzymes les plus utilisées en industrie et les plus décrites dans la littérature pour ses performances catalytiques. Cette enzyme a donc été prise comme principale référence dans cette thèse.

Tableau 1-1 : Réactions catalysées par les lipases

Réaction		Référence
<b>Réaction dans l'eau (a<sub>w</sub> élevé)</b>		
Hydrolyse	$R_1COOR_2 + HOH \Rightarrow R_1COOH + R_2OH$	(Salihu et al., 2011 ; Grbavčić et al., 2011)
<b>Réaction en milieu non-aqueux (a<sub>w</sub> faible)</b>		
Estérification	$R_1COOH + R_2OH \Leftrightarrow R_1COOR_2 + HOH$	(Lortie, 1997 ; Krishna, Karanth, 2002 ; Kraai et al., 2008 ; Hommes et al., 2019)
Transestérification	$R_1COOR_2 + R_3COOR_4 \Leftrightarrow R_1COOR_4 + R_3COOR_2$	(Narwal, Gupta, 2013 ; Tiosso et al., 2014 ; Canet et al., 2016)
Aminolyse	$R_1COOR_2 + R_3NH_2 \Leftrightarrow R_1CONHR_3 + R_2OH$	(Zeng et al., 2018)
Amidation	$R_1COOH + R_2NH_2 \Leftrightarrow R_1CONHR_2 + HOH$	(Manova et al., 2018)

### 1.2.2 Structure et mécanisme catalytique des lipases

Les lipases sont principalement des protéines monomériques d'une taille entre 20 et 60 kDa. La conformation de la cavité du site actif de ces enzymes présente une architecture similaire formée d'une large poche catalytique avec une partie hydrophobe permettant l'attraction de l'acide gras et au fond de laquelle se trouvent les résidus catalytiques (Pleiss et al., 1998). Ces derniers sont répartis en plusieurs sous-groupes selon la différence de forme et la taille de la cavité du site actif qui change d'une lipase à l'autre. Cette diversité structurale au niveau du site actif peut expliquer les différentes propriétés de spécificité de substrats et de sélectivité des lipases (De Oliveira et al., 2009). CALB est une protéine monomérique de 33 kDa formée de 317 résidus d'acides aminés dont la structure cristallographique a été élucidée par Uppenberg et al (1994). L'enzyme est constituée de 7 feuillets  $\beta$  séparés par 10 hélices  $\alpha$  et 15 segments de boucle ainsi que 2 autres brins  $\beta$  situés à l'extrémité C-terminale de la protéine (Figure 1.4). Les résidus catalytiques de cette enzyme sont situés au fond d'une cavité étroite et profonde d'une largeur de 10 Å x 4 Å et d'une profondeur de 12 Å. En plus de la triade catalytique constituée d'une sérine (Ser105), d'une histidine (His224) et d'un acide aspartique (Asp187), l'implication du trou oxyanionique formé d'une glutamine (Gln106) et d'une thréonine (Thr40), lors de la réaction, est importante. Ces derniers résidus permettent de stabiliser les intermédiaires tétraédriques formés lors du processus catalytique par des liaisons hydrogène (Uppenberg et al., 1994a ; 1995 ; Ferrari et al., 2014a). La cavité catalytique comporte deux zones dont une hydrophobe permettant l'attraction du donneur d'acyle et une

deuxième hydrophile formée des résidus Asp134, Gln106 et Thr40 proche de la Ser105 (Pleiss et al., 1998).

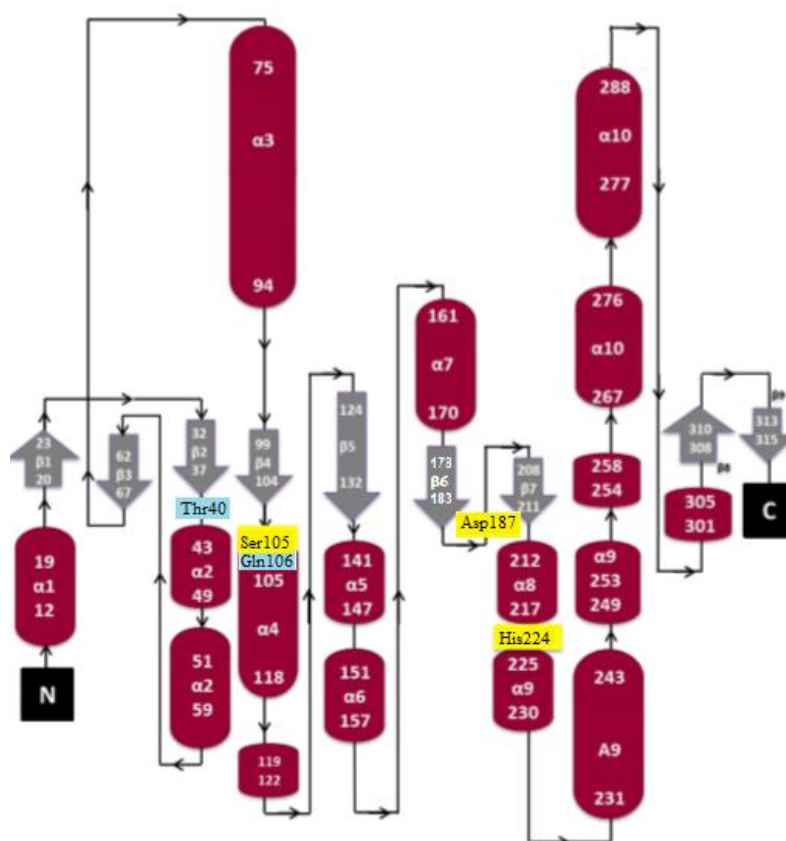


Figure 1.4 : représentation graphique de la structure secondaire de CALB, en jaune : la triade catalytique, en bleu : les résidus du trou oxyanion, flèches grises : les feuillets  $\beta$ , et les cylindres grenade : les hélices  $\alpha$  (Stauch et al., 2015)

Le mécanisme catalytique des lipases, dont CALB, est similaire à celui des sérines hydrolases (Fuentes et al., 2004). En général, c'est le mécanisme bi-bi ping-pong, qui passe par plusieurs intermédiaires tétraédriques, qui décrit le mécanisme catalytique de CALB (figure 1.5) (Arcos et al., 2001 ; Husson et al., 2010a). Ce mécanisme débute par la déprotonation de la sérine catalytique (Ser105) formant ainsi un résidu nucléophile qui attaque le groupement ester ou amide (cas de l'hydrolyse) ou un groupement réactif (hydroxyle, carboxyle ou amine). Le proton libéré est ensuite récupéré par l'His 224. Le résidu Ser 105 déprotoné est stabilisé par deux groupements NH, ou autres groupements similaires, des résidus aux alentours avant attaque de la liaison ester ou autre, dans le cas de l'hydrolyse, ou du groupement carboxylique ou autre du donneur d'acyle, dans le cas de la synthèse. Cela conduit à la formation du premier intermédiaire tétraédrique, appelé acyl-enzyme, par la formation d'une liaison covalente entre l'acide et l'enzyme et la libération de l'alcool ou l'amine, dans le cas de l'hydrolyse. L'eau ou l'accepteur d'acyle est par la suite déprotoné par le cycle imidazole de l'histidine qui transfère



cette charge vers le groupement carboxylique de l'acide aspartique. Cela engendre la formation d'une liaison covalente entre l'acide et le groupement déprotoné et la libération du produit final ainsi que la récupération de l'état initial de l'enzyme (Ferrari et al., 2014a ; Hanefeld, Lefferts, 2018).

Afin de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction vers une réaction de synthèse et de maintenir l'activité et la stabilité de l'enzyme, le contrôle des conditions opératoires et des paramètres influençant les performances des lipases est important. En effet, les propriétés physicochimiques des solvants réactionnels et des substrats influencent énormément les performances catalytiques des lipases lors des réactions de synthèse.

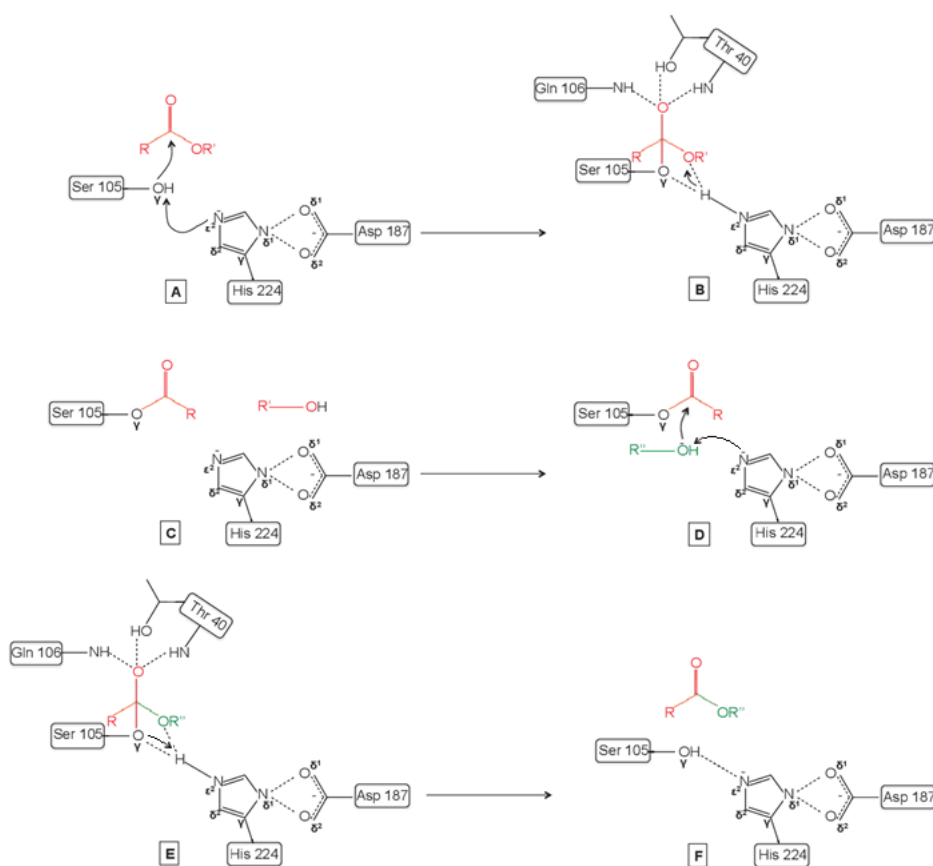


Figure 1.5 : Mécanisme d'acylation catalysé par la triade catalytique de CALB selon le modèle bi-bi ping-pong: A) conformation native et approche du substrat donneur d'acyle ; B) premier intermédiaire tétraédrique ; C) relargage de l'alcool et formation de l'acyl-enzyme ; D) approche de l'accepteur d'acyle ; E) formation du second intermédiaire tétraédrique ; F) relargage du produit et retour à la conformation initiale de l'enzyme (Ferrari, 2014a).

### 1.2.3 Paramètres influençant les réactions en milieu non-aqueux

#### 1.2.3.1 Influence de la teneur en eau

Afin de déplacer l'équilibre thermodynamique des réactions catalysées par les lipases vers la synthèse et de stabiliser la réaction dans ce sens, le contrôle de la quantité d'eau libre dans le

milieu réactionnel et au cours de la réaction est primordial. De très faibles variations de teneur en eau du milieu réactionnel peuvent aboutir à une absence totale de synthèse ou à l'hydrolyse des produits de synthèse (Dorr, Fuerst, 2018). Cette influence est dépendante des lipases et du solvant utilisés mais la présence d'une certaine quantité d'eau est essentielle au maintien d'une flexibilité conformationnelle et à la présence d'une couche d'hydratation nécessaire à l'activation de l'enzyme (Klibanov, 1989 ; Daniel, Finney, Stoneham, Clark, 2004 ; Daniel, Finney, Stoneham, Halling, 2004). Dans tous les cas, la quantité optimale d'eau libre, évaluable *via* la mesure de l'activité de l'eau ( $a_w$ ), doit si possible être connue ou évaluée. L'évolution de l'activité en fonction de la teneur en eau suit une courbe en cloche avec un maximum d'activité généralement aux faibles  $a_w$  et variable selon l'enzyme utilisée (Villeneuve, 2007). Kontogianni et al. (2001) ont étudié l'influence de l'activité de l'eau sur la réaction d'estérification des flavonoïdes (naringin) avec l'acide décanoïque dans du *tert*-butanol en présence de CALB immobilisée (Novozyme435). Ils ont démontré qu'une  $a_w$  inférieure à 0,11 était la plus adaptée à l'activité d'acylation et qu'au-delà de cette valeur une importante perte d'activité est enregistrée jusqu'à arrêt complet de la synthèse à 0,75 d' $a_w$  (Kontogianni et al., 2001). La valeur de l' $a_w$  optimale vis-à-vis de l'activité enzymatique dépend aussi du solvant organique utilisé en particulier de sa polarité. Vaisali et al., (2017) ont ainsi observé que pour la réaction d'estérification de la rutine avec l'acide décanoïque, l' $a_w$  optimale était de 0,07 dans l'acétone alors qu'elle était de 0,23 dans le *tert*-butanol qui est un solvant plus polaire (Vaisali et al., 2017).

La présence d'une quantité d'eau très importante dans le milieu réactionnel conduit au déplacement de l'équilibre thermodynamique de la réaction vers une réaction d'hydrolyse. L'eau peut aussi causer des limitations diffusionnelles des substrats vers le site actif suite à la formation de plusieurs couches d'hydratation à leur surface (Mora-Pale et al., 2007). Afin de contrôler la quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel, plusieurs moyens peuvent être envisagés tels que l'utilisation de tamis moléculaire ou de polymères super-absorbants qui permettent de retenir les molécules d'eau au fur et à mesure de leur apparition lors des réactions d'estérification (Duan et al., 2006 ; Husson et al., 2009a ; Nguyen et al., 2018). Une fois leur capacité d'adsorption d'eau maximale atteinte, ils doivent être récupérés et régénérés. L'immobilisation des lipases sur des supports très hydrophobes peut aussi améliorer les performances enzymatiques en réduisant le contact entre l'eau et les enzymes (Graebin et al., 2012). Ces dernières méthodes peuvent aussi être associées à l'utilisation des ultrasons qui permettent de décrocher les molécules d'eau en excès autour de l'enzyme (Alves et al., 2014 ;

Paludo et al., 2015). L'élimination de l'eau en continu en réalisant la réaction sous vide est aussi une manière très attractive permettant d'éviter son accumulation (Tufvesson et al., 2007).

### 1.2.3.2 Influence de l'état d'ionisation

Les accepteurs d'acyle tels que les acides aminés et peptides et les donneurs d'acyle tels que les acides gras utilisés lors des réactions d'acylation en particulier pour la réaction de N-acylation comportent tous des groupements (amine ou carboxylique) potentiellement ionisables. La présence de substrats ionisés lors des réactions en milieux non aqueux peut influencer le taux de conversion en agissant sur la solubilité du substrat ou la disponibilité des groupements nucléophiles nécessaires à la réaction. Il est possible d'observer des interactions électrostatiques entre le groupement amine protoné de l'accepteur d'acyle et le groupement carboxylique de l'acide gras conduisant à la formation de complexes ioniques. L'influence de l'état d'ionisation des substrats sur la réaction a été décrite par Maugard et al., (1997) lors de l'acylation du N-méthyl-glucamine avec de l'acide oléique par la lipase de *Rhizomucor miehei* dans l'hexane. La formation d'un complexe ionique entre les substrats, appelé paire d'ions, a permis une amélioration de leur solubilité et ainsi la faisabilité de la réaction (Maugard et al., 1997 ; 1998). Ils ont aussi décrit une relation entre le ratio accepteur/donneur d'acyle et la chimio-sélectivité de cette lipase. Plus ce ratio est faible, plus il y a de molécules aminées favorisant l'amidation du substrat. Par ailleurs, dans plusieurs autres cas, la formation de paires d'ions ne contribue pas à une meilleure solubilisation du substrat mais, au contraire, à leur précipitation réduisant ainsi leurs taux de conversion (Fernández-Pérez, Otero, 2001 ; 2003). Husson et al. (2008) n'ont pas montré d'influence de l'état d'ionisation sur la solubilité du 6-amino-1-hexanol et de l'acide oléique ou de son ester éthylique dans les différents milieux réactionnels (2-méthyl-2-butanol ou M2B2, liquide ionique et milieu fondu) mais un effet très important sur la réactivité de CALB par la modification de la chimio-sélectivité en fonction du milieu utilisé et donc de l'état d'ionisation (Husson et al., 2008a). Dans une autre étude, les auteurs ont observé une influence négative de la formation de paires d'ions sur l'activité de CALB lors de l'acylation du dipeptide Lys-Ser avec l'acide oléique (Husson et al., 2009a). L'ajout d'une base organique (triéthylamine = TEA) en excès (20 fois la concentration molaire de l'accepteur d'acyle) a permis d'améliorer la réactivité de l'enzyme et ainsi d'augmenter le taux de conversion. En effet, l'ajout de TEA dans le milieu réactionnel permet de neutraliser les charges, en particulier celles de l'accepteur d'acyle, permettant la réactivité de la sérine catalytique de l'enzyme avec les groupements nucléophiles du substrat aminé (acide aminé ou peptide). Dettori et al. (2018) ont réalisé la réaction de N-acylation de la lysine avec l'acide

laurique en présence de CALB dans le solvant organique M2B2 avec ou sans ajout de cette base. Ils ont observé une perte presque totale de l'activité enzymatique (présence de trace de produit) en l'absence de TEA dans le milieu réactionnel alors que la présence de 2,4 M de ce dernier a permis d'augmenter le taux de conversion de l'acide gras à environ 40% (Dettori, et al., 2018a).

### 1.2.3.3 Impact de la température

La température est l'un des paramètres les plus importants lors de la mise en œuvre des réactions enzymatiques. Le choix de la température de la réaction dépend de la lipase, du milieu réactionnel et des substrats utilisés pour la réaction de synthèse (Sá et al., 2017). En effet, chaque lipase est active dans une gamme de température spécifique dans laquelle un optimum est souvent défini en fonction de la capacité d'échange de chaleur, de la polarité du milieu réactionnel et des quantités de substrat et d'enzyme utilisées (Nguyen et al., 2018 ; Soo et al., 2004a).

Plusieurs auteurs ont décrit une augmentation du taux de conversion en fonction de la température lors des réactions d'acylation avec une différence importante selon l'acide gras utilisé (Soo et al., 2003a). Cet effet est lié à la température de fusion de l'acide gras. L'augmentation de la température permet une solubilisation plus importante de l'acide gras et une réduction de la viscosité du milieu améliorant l'accessibilité du substrat au site actif, permettant d'augmenter considérablement le taux de conversion en particulier lors de la N-acylation des acides aminés (Montet et al., 1990 ; Husson et al., 2009a ; Dettori, 2017 ; Salvi et al., 2018). Plusieurs auteurs ont choisi une température de 55°C lors des réactions d'acylation des acides aminés et peptides par CALB afin d'avoir une bonne activité tout en évitant la dénaturation de cette lipase (Husson et al., 2008a ; Dettori et al., 2018a). En effet, Yu et al. (2020) ont étudié l'influence de la température sur la réaction de N-acylation du tripeptide Lys-His-Ala avec l'acide laurique à un ratio molaire de 1 dans du 2-méthyl-2-butanol. Ils ont observé une augmentation de l'activité enzymatique à des températures comprises entre 35 et 55°C liée à la diminution de la viscosité du milieu réactionnel suivie d'une perte d'activité à des températures supérieures à 55°C due à la dénaturation de l'enzyme (Yu et al., 2020).

### 1.2.3.4 Influence du substrat et du choix du solvant réactionnel

Le choix du substrat est un paramètre critique pour la bonne mise en œuvre des réactions d'acylation. Les lipases présentent toutes une spécificité de substrat très variable qui dépend de plusieurs paramètres tels que leur conformation tridimensionnelle et en particulier celle du site actif ainsi que la nature des résidus qui forment sa cavité, la nature des substrats et du solvant

réactionnel utilisés. En effet, l'activité enzymatique des lipases dépend de l'affinité du substrat pour les résidus d'acides aminés formant le site actif en particulier ceux autour des résidus catalytiques. La présence du substrat au niveau du site catalytique va générer des modifications structurales réduisant la flexibilité de certaines zones de l'enzyme (Yagnik et al., 1997 ; Peters et al., 1997 ; 1998 ; Peters, Bywater, 1999 ; Lee et al., 2000). Certains auteurs ont utilisé les outils de modélisation moléculaire afin de justifier l'absence d'acylation de certains flavonoïdes (quercétine) en présence de CALB en comparaison avec la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL) qui était capable de catalyser cette réaction (Chebil et al., 2007a ; Bidouil, Eduardo, et al., 2011). La comparaison des interactions entre la quercétine et les résidus formant le site catalytique des deux lipases a montré que l'absence d'acylation de la quercétine par CALB était due à la formation d'interactions hydrophobes avec les résidus Ile189 et Ile285 qui empêchent l'entrée du substrat vers les résidus catalytiques de CALB présents au fond d'une cavité étroite et profonde. D'autre part, l'absence d'interactions défavorables avec les résidus catalytiques et le positionnement des résidus catalytiques de la PCL dans une cavité moins profonde réduit les limitations de transfert du substrat vers la triade catalytique permettant une bonne activité enzymatique (Pleiss et al., 1998 ; Bidouil et al., 2011). De même, la chimio- et régiosélectivité des lipases est influencée par les interactions moléculaires (liaison hydrogène, hydrophobe et électrostatique) entre le substrat et les résidus d'acides aminés de la cavité catalytique (Syren et al., 2013 ; Ferrari et al., 2014a ; Dettori, et al., 2018a). Cette sélectivité dépend aussi du milieu réactionnel, de la forme du substrat (i.e. protection des groupements carboxyliques par l'utilisation d'ester d'acide aminé), de l'état d'ionisation des groupements nucléophiles du substrat (groupement carboxylique ou amine) et de la nature et de la longueur du groupement en position  $\beta$  du groupement nucléophile de l'accepteur d'acyle (Kontogianni et al., 2001 ; Pedersen et al., 2002 ; Goujard et al., 2004 ; Husson et al., 2008a ; Le Joubioux et al., 2013 ; Jiang et al., 2015). Dans le cas de l'acylation des acides aminés et peptides en présence de CALB, plusieurs auteurs ont démontré que cette enzyme catalysait la réaction de N-acylation de la lysine et de peptides contenant la lysine avec plusieurs acides gras en solvant organique, spécifiquement sur l'amine de la chaîne latérale de l'accepteur d'acyle avec très peu de réaction sur les autres groupements potentiellement acylables (Ferrari et al., 2014a ; Dettori et al., 2018a). Les études par modélisation moléculaire ont permis d'expliquer ces résultats par le positionnement préférentiel du groupement amine de la chaîne latérale de l'accepteur d'acyle très proche de la triade catalytique permettant une bonne réactivité du substrat. Par ailleurs, l'étude par modélisation moléculaire des possibles interactions entre la glycine et les résidus catalytiques a montré une instabilité de celle-ci au niveau de la cavité catalytique expliquant

l'absence d'acylation de cet acide aminé. La modification de la structure de ce dernier en utilisant des dérivés esters a permis l'établissement de meilleures interactions et a conduit à l'obtention d'un produit d'acylation confirmée expérimentalement (Dettori, 2017). Par ailleurs, très peu d'études ont été menées sur la N-acylation des autres acides aminés.

La concentration des substrats utilisés joue un rôle important dans les performances catalytiques des enzymes. Plusieurs auteurs ont montré que l'augmentation du ratio molaire des substrats en faveur de l'acide gras permettait une amélioration significative du taux de conversion mais une très importante concentration de ce dernier peut être inhibitrice de l'activité enzymatique (Soo et al., 2003a ; Husson et al., 2010b ; Ren, Lamsal, 2017 ; Yu et al., 2020).

La solubilité des substrats dans le milieu réactionnel est l'un des paramètres les plus importants lors de l'acylation en milieu non aqueux. Lors des réactions en solvants apolaires tels que les solvants organiques et le CO<sub>2</sub> supercritique, la solubilité du donneur d'acyle (acide gras) va dépendre de son LogP (coefficient de partage octanol/eau) par rapport à celui du solvant et sa température de fusion (Montet et al., 1990 ; Soo et al., 2003a). Plusieurs auteurs ont montré que l'augmentation de la polarité du solvant organique permet une augmentation de l'activité des lipases en améliorant la solubilité des substrats et en stabilisant la conformation active de l'enzyme en particulier quand le LogP du solvant est supérieur à 3 (Soo et al., 2004a ; Villeneuve, 2007 ; Salihu, Alam, 2015 ; Li et al., 2015). L'usage d'acide gras à plus de 12 carbone réduit considérablement leur solubilité dans le milieu réactionnel conduisant à des limitations de transfert de ce dernier vers le site actif. C'est pourquoi une optimisation des conditions opératoires (solvant organique et température) doit être réalisée pour chaque type de réaction, de substrat et d'enzyme (Vaysse et al., 2002 ; Pedersen et al., 2002 ; Salem et al., 2010). La solubilité de l'accepteur d'acyle joue un rôle prépondérant lors des réactions d'acylation surtout lors de la réaction de N-acylation des molécules très hydrophiles telles que les acides aminés et les peptides. Afin de pouvoir solubiliser au moins partiellement les deux substrats lors de ces réactions, l'utilisation d'alcools tertiaires tels que le 2-méthyl-2-butanol s'avère intéressante (Villeneuve, 2007 ; Husson et al., 2010b ; Yu et al., 2020). Par ailleurs, la faible solubilité de ces molécules a souvent été décrite comme un frein au développement de procédés d'acylation enzymatique des acides aminés en solvants non aqueux tels que les solvants organiques et le CO<sub>2</sub> supercritique (Needham et al., 1971 ; Sheldon, 2016). Afin de remédier à ce problème, plusieurs stratégies ont été adoptées soit par la modification des propriétés physicochimiques du substrat ou par le développement de nouveaux solvants ou l'utilisation de milieux biphasiques permettant la solubilisation des deux substrats (Sheldon, Woodley, 2018b). Plusieurs auteurs ont utilisé des esters d'acides aminés comme accepteurs

d'acyle lors des réactions de N-acylation avec des acides gras dans des solvants organiques et milieu fondu (Valivety et al., 1997 ; Piera et al., 2000 ; Goujard et al., 2004). Les solvants néoteriques (liquides ioniques et solvants eutectiques) présentent aussi une alternative très attractive dans une perspective de développement industriel. Leurs propriétés physicochimiques peuvent être modulées afin de permettre une bonne solubilisation des deux substrats (Yang, Pan, 2005 ; Durand et al., 2015a). L'utilisation de milieux biphasiques combinant un solvant hydrophile (milieux aqueux, liquides ioniques, ...) solubilisant le substrat hydrophile et un solvant hydrophobe (solvants organiques, CO<sub>2</sub> supercritique, ...) solubilisant le substrat hydrophobe a aussi été décrite comme un moyen très efficace pour augmenter l'activité enzymatique et faciliter la séparation et la récupération du produit final (Lozano, Alvarez, et al., 2017 ; Gérard et al., 2017 ; Villa et al., 2019). En conclusion, le choix du solvant organique le plus adapté à chaque réaction et à chaque enzyme est une étape critique dans le développement de procédé durable d'acylation enzymatique. Par ailleurs, l'éco-compatibilité du procédé enzymatique dépend de l'impact du solvant réactionnel sur l'environnement en incluant sa production, son utilisation, son recyclage et sa dégradation en fin de vie (Sheldon, 2012). Les différents solvants présentent tous des avantages et des inconvénients lors des réactions enzymatiques qui seront présentées ultérieurement.

### 1.2.4 Acylation enzymatique sous CO<sub>2</sub> supercritique

#### 1.2.4.1 Les fluides supercritiques et le CO<sub>2</sub>

On parle de fluide supercritique lorsqu'un fluide est chauffé au-delà de sa température critique et lorsqu'il est comprimé au-dessus de sa pression critique. Comme indiqué dans le diagramme d'état du CO<sub>2</sub> supercritique dans la Figure 1.6, le point critique se trouve à l'extrémité de la courbe de transition liquide-gaz. À ce niveau et au-delà de ce point la limite entre phase liquide et phase gazeuse n'est plus claire et une seule phase homogène reste visible (figure 1.7) (Andrews, 1869 ; Hobbs, Thomas, 2007). Dans le cas du CO<sub>2</sub> supercritique, la température et la pression critiques sont 31,1°C et 73,8 bars respectivement. Au-delà de ces valeurs critiques le solvant présente une densité similaire à celle d'un liquide mais une viscosité comparable à celle d'un gaz et une diffusivité intermédiaire. On parle ainsi de gaz dense ou de liquide expansé permettant un très bon transfert de matière lors de son utilisation (tableau 1.2) (Attard, Hunt, 2018a). En jouant sur le couple pression-température on peut aisément contrôler la densité et la viscosité du fluide supercritique et ainsi contrôler son potentiel solubilisant vis-à-vis d'un soluté donné ainsi que la constante diélectrique du fluide (Leitner, 2000 ; Attard, Hunt, 2018a). Les conditions critiques sont propres à chaque molécule et solvant (annexe 2).

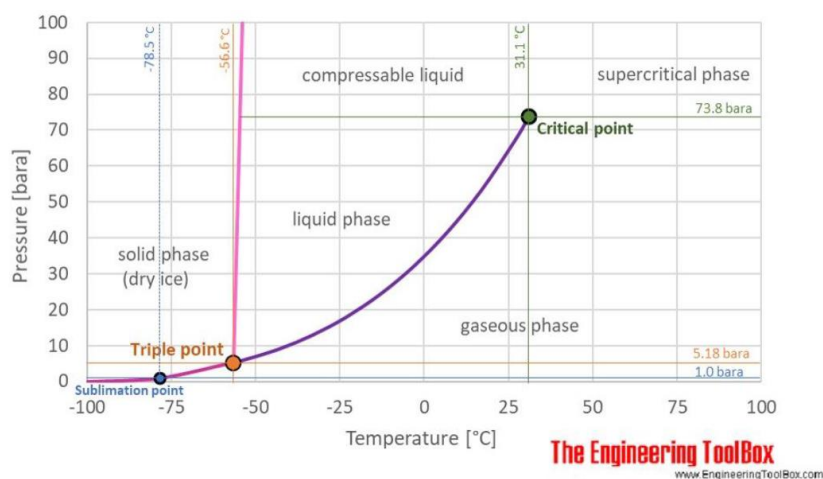


Figure 1.6 : diagramme de phase du CO<sub>2</sub> (www.EngineeringToolbox.com)

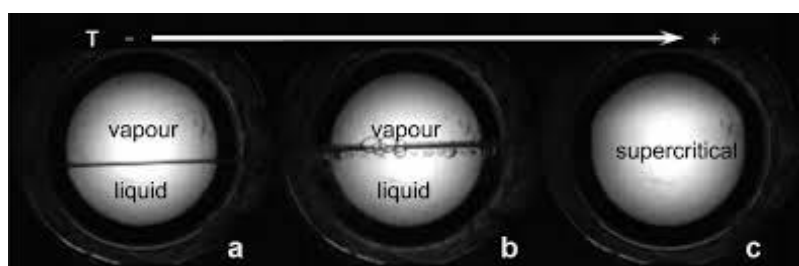


Figure 1.7 : observation du passage de l'état liquide (a) à l'état supercritique (c) au cours du temps en passant par une étape de transition (b) suite à l'augmentation de la pression et de la température (Hobbs, Thomas, 2007)

Tableau 1-2 : propriétés thermo-physiques des liquides, gaz et fluides supercritiques (Attard, Hunt, 2018a)

Fluide	Densité (kg / m <sup>3</sup> )	Coefficient de diffusion (m <sup>2</sup> / s)	Viscosité (Pa * s)
Liquide	800 - 1200	10 <sup>-8</sup> - 10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-3</sup> - 10 <sup>-2</sup>
Fluide supercritique	250 - 800	10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-3</sup>
Gaz	1 - 100	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup> - 10 <sup>-4</sup>

Aujourd'hui, le CO<sub>2</sub> supercritique et l'eau supercritique sont de loin les fluides les plus étudiés et utilisés. Par ailleurs, les conditions critique de l'eau (220°C et 374 bars) ne sont pas compatibles avec le domaine de la catalyse enzymatique ou de l'extraction de molécules à partir de matériaux biologiques végétaux ou animaux contrairement au CO<sub>2</sub> supercritique. Pour ce dernier, son faible coût, sa non inflammabilité, sa forte inertie chimique, sa non toxicité dans des conditions normales d'emploi, sa recyclabilité, la facilité de réglage fin de sa densité, de sa viscosité et diffusivité par contrôle de la pression et de la température en font un solvant particulièrement respectueux de l'environnement, dit « vert », et technologiquement intéressant (Ghanem, 2007 ; Sheldon, Woodley, 2018a). C'est ce qui explique le succès croissant du CO<sub>2</sub> supercritique pour toute une gamme d'applications (analyse par chromatographie supercritique,



extraction, cristallisation, précipitation par effet anti-solvant, encapsulation des molécules et comme solvant réactionnel en catalyse enzymatique).

Ces propriétés permettent de répondre aux exigences réglementaires en termes de restriction d'utilisation de solvants volatiles toxiques pour la production de molécules à intérêt pharmaceutique et alimentaire (Badgular et al., 2013 ; Attard, Hunt, 2018b). Il est considéré comme « Generally Recognized As Safe » (GRAS) et présente le gros avantage d'être « food compatible ». Enfin, comme il devient gazeux à pression atmosphérique, sa simple dépressurisation permet la séparation du produit et du CO<sub>2</sub>, qui peut être recyclé pour plusieurs utilisations, permettant une très importante économie de temps et une réduction des étapes de production ou d'extraction de molécules (Badgular et al., 2013).

### 1.2.4.2 Paramètres influençant les réactions sous CO<sub>2</sub> supercritique

#### 1.2.4.2.1 Solubilité et solubilisation des composés

La solubilité d'un soluté assez apolaire et/ou suffisamment volatile dans le CO<sub>2</sub> supercritique est fonction de la densité de ce CO<sub>2</sub>. L'Equation d'Etat (EoS) développée par Span et Wagner en 1996 permet de calculer la densité du CO<sub>2</sub> pur et son état (gaz, liquide ou supercritique) (Span, Wagner, 1996). En pratique, certains sites gratuits et fiables peuvent être utilisés pour calculer directement certaines propriétés du CO<sub>2</sub> à partir de sa pression et de sa température (<http://www.energy.psu.edu/tools/CO2-EOS/index.php>).

La solubilité des composés sous scCO<sub>2</sub> est exprimée soit en concentration (S : g soluté / L de scCO<sub>2</sub>) ou en fraction molaire soluble d'un soluté dans le scCO<sub>2</sub> à température ambiante et à pression atmosphérique (g / L) (Ying Li et al., 2013). Des modèles semi-empiriques, basés sur des régressions non-linéaires à partir de points expérimentaux et permettant de prévoir la solubilité d'un soluté à partir de la densité du CO<sub>2</sub> et de sa température ont été générés. Le plus connu et encore largement utilisé pour sa fiabilité est celui de Chrastil (Chrastil, 1982). D'autres modèles, selon les types de solutés et plus ou moins inspirés de celui de Chrastil ont ensuite été proposés dont certains sont présentés dans l'annexe 3 (Kumar, Johnston, 1988 ; Bartle et al., 1991 ; Jiang et al., 1998 ; Méndez-Santiago, Teja, 1999 ; Sung, Shim, 1999 ; Jouyban et al., 2002). Plusieurs auteurs ont utilisé ces équations pour la prédiction de la solubilité des molécules sous scCO<sub>2</sub> (Tang et al., 2012 ; Ying Li et al., 2013 ; Lamba et al., 2016). Sparks et al. (2010), ont par ailleurs utilisé le modèle d'Adachi et al. (1982) pour modéliser avec succès la solubilité des acides gras à courte chaîne (7, 8 et 9 carbones) (Adachi, Lu, 1983 ; Sparks et al., 2010)

Le caractère hydrophobe du  $\text{scCO}_2$  permet une bonne solubilisation des molécules hydrophobes qui est améliorée par l'augmentation de la pression qui permet d'augmenter la densité du solvant (Chrastil, 1982 ; Jiang et al., 1998 ; Arenas-Quevedo et al., 2017). La température influence aussi la solubilité de ces composés, en particulier dans le cas des acides gras par la réduction de la viscosité de ces derniers facilitant leur entrainement. Arenas-quesvedo et al. (2017) ont étudié la solubilité de plusieurs molécules dont l'acide palmitique et la capsaïcine sous  $\text{scCO}_2$  à différentes températures (35 et 55°C) et différentes pressions (de 10 à 35 MPa). Ils ont démontré que l'augmentation de la température pour la même pression a permis d'augmenter la fraction molaire soluble de l'acide palmitique de 0,82 à  $15,37 \times 10^3$  et de 0,142 à  $0,529 \times 10^3$  pour la Capsaïcine à 35 MPa (Arenas-Quevedo et al., 2017). Cette différence est due à la différence d'hydrophobie des deux molécules. Par ailleurs, l'augmentation de la température en maintenant la même pression conduit à une diminution de la densité du  $\text{scCO}_2$  ce qui peut conduire à une réduction de son pouvoir solvant en particulier lorsque les molécules présentent une faible température de fusion. Le maintien d'une densité par ajustement de la pression en augmentant la température permet d'améliorer la solubilisation des molécules (Ashraf-Khorassani et al., 1995). Par ailleurs, il ne faut pas négliger la possible oxydation des molécules contenant une insaturation, solubilisée dans le  $\text{scCO}_2$  due à la présence d'oxygène qui peut modifier la structure des molécules récupérées à la fin du procédé (Cocero et al., 2000). D'autre part, le  $\text{scCO}_2$  ne permet pas la solubilisation des molécules hydrophiles telles que les sucres, les protéines et les acides aminés. Plusieurs auteurs ont étudié la solubilité des acides aminés dans le  $\text{scCO}_2$  et ont déterminé des valeurs de fraction molaire soluble de ces molécules de l'ordre de  $10^{-8}$  (Stahl et al., 1978 ; Vedaraman et al., 2004a). Afin de remédier à ce problème, plusieurs stratégies peuvent être testées. Plusieurs auteurs ont proposé une réduction du caractère hydrophile des acides aminés en greffant des groupements hydrophobes par estérification, amidation ou les deux avant leur utilisation (Lou et al., 1990 ; Vedaraman et al., 2004a ; Freitag et al., 2007). Vedaraman et al. (2003) ont décrit une augmentation de la solubilité de la valine, de la proline et de l'acide aspartique d'une fraction molaire soluble de l'ordre de  $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  en rajoutant un carboxybenzyle (CBZ) sur le groupement amine. Freitag et al. (2007) ont réussi à augmenter la fraction soluble de la N-acétyl-phénylalanine et de la N-acétyl-tyrosine en utilisant leurs dérivés éthyle-esters passant ainsi d'un ordre de grandeur de  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  et de  $10^{-6}$  à  $10^{-5}$  respectivement. La deuxième stratégie consiste à ajouter des co-solvants tels que le méthanol, en l'occurrence le plus utilisé et le plus efficace, l'éthanol, l'acétonitrile, l'acétone, le dichlorométhane ou même l'eau, ce qui a permis une amélioration considérable de la solubilité des molécules hydrophiles (Ashraf-Khorassani et al., 1995 ;

Smallridge et al., 2002 ; Shen et al., 2008 ; Arnáiz et al., 2012 ; Varae et al., 2019). Enfin, la formation de micelles formées d'eau et de tensioactifs dans lesquels les acides aminés ou peptides sont piégés peut aussi être envisagée (Soriano et al., 2008). Mais la présence d'eau peut être impliquée dans d'autres mécanismes qui perturbent l'activité enzymatique et qui seront présentés par la suite.

### 1.2.4.2.2 Influence de l'eau sur l'activité enzymatique

La présence d'une certaine quantité d'eau à la surface de l'enzyme est essentielle à son activité (Habulin, Zeljko Knez, 2001). Cette eau va permettre la solvataion des sites contenant les résidus hydrophiles, les résidus hydrophobes seront occupés par le scCO<sub>2</sub>, conduisant à une stabilisation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme dans une conformation active. Silveira et al. (2012) ont étudié la solvataion de CALB sous scCO<sub>2</sub> en présence d'eau par modélisation moléculaire (figure 1.8). En présence de la première couche de solvataion, ils ont démontré que le scCO<sub>2</sub> recouvre tous les résidus hydrophobes de la surface de l'enzyme dont sa cavité catalytique permettant l'amélioration de l'accessibilité des substrats hydrophobes. Par ailleurs, en augmentant la quantité d'eau présente, cette dernière tente de recouvrir plus de surface bloquant ainsi l'accès du scCO<sub>2</sub> aux résidus catalytiques (Silveira et al., 2012).

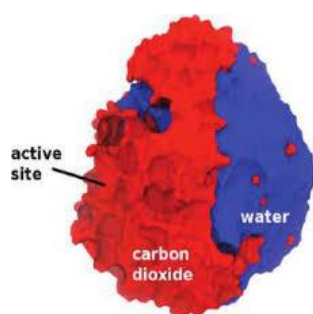
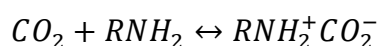


Figure 1.8 : représentation de la structure de CALB sous scCO<sub>2</sub> (Silveira et al., 2012)

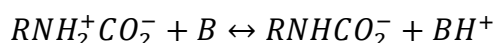
La solubilité de l'eau dans le scCO<sub>2</sub> est faible (entre 0,3 et 0,5 % massique d'eau) mais cela reste supérieur à sa solubilité dans les solvants organiques tels que le décane (1,3 g / L à 32°C et 100 bar) (Marty, Condoret, 2001 ; Knez, Habulin, 2002). Cette solubilité est très variable selon la pression et la température utilisées (Marty, Condoret, 2001). Ceci peut être très bénéfique lors de la mise en œuvre en continu des procédés d'estérification et d'amidation de molécules mais une élimination trop importante de l'eau présente à la surface de l'enzyme peut induire une perte d'activité enzymatique (Oliveira et al., 2006 ; Dos Santos, Zobot, et al., 2016). Par ailleurs, une accumulation d'eau autour de l'enzyme peut conduire à la perturbation de l'activité enzymatique par implication de différents phénomènes. La dissolution du CO<sub>2</sub> dans le microenvironnement aqueux cause la formation d'acide carbonique H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> réduisant ainsi le

## Chapitre I : Étude bibliographique

pH autour de l'enzyme et contribuant à la formation de carbamate avec les amines pouvant alors affecter négativement l'activité enzymatique (Kamat et al., 1992). En effet, l'acidification du milieu favorise la présence des amines sous forme protonée  $\text{NH}_3^+$  incompatible avec la réaction d'acylation. De plus les fonctions amines des acides aminés sont fortement susceptibles de former des ions carbamates ( $\text{RNHCO}_2^-$ ) en particulier si une base est ajoutée pour contrebalancer le phénomène d'acidification (Yamamoto et al., 2012). Caplow, (1968) a démontré la possible apparition de cette réaction, qui est très étudiée depuis pour piéger le  $\text{CO}_2$  des fumées post-combustion industrielles par des amines suivant la formule :



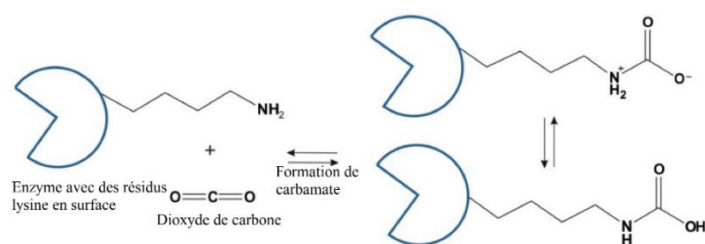
Puis, en présence d'une base,



Les enzymes et les protéines en général sont très susceptibles de former des liaisons covalentes réversibles (carbamate instable) entre le  $\text{CO}_2$  et l'amine de la chaîne latérale de la lysine ou potentiellement le groupement imidazole de l'histidine (figure 1.9). Les protéines retrouvent leur état initial suite à la dépressurisation (Hobbs, Thomas, 2007). Ces liaisons sont stables à basse température mais l'augmentation de la température conduit à la libération du  $\text{CO}_2$ . L'effet de la formation de carbamates sur l'activité enzymatique est très variable selon l'enzyme, la réaction ciblée et les conditions de mise en œuvre. Certains auteurs ont décrit une amélioration de l'activité et de la sélectivité des enzymes après interaction du  $\text{CO}_2$  avec les amines des résidus présents à l'opposé du site actif (Matsuda et al., 2003 ; Mase et al., 2003). D'autres auteurs ont décrit une inactivation de l'enzyme par interaction du  $\text{CO}_2$  avec les amines des résidus autour de la cavité catalytique conduisant au blocage du site actif (Kamat et al., 1995 ; Habulin, Zeljko Knez, 2001 ; Dos Santos, Rezende, et al., 2016a). Dans le même cadre, la présence de groupements amine libres lors de l'acylation de molécules telles que les acides aminés et peptides sous  $\text{scCO}_2$  peut aussi réagir avec le  $\text{CO}_2$  suivant la même réaction réduisant ainsi la disponibilité de ces groupements amines pour la réaction. La diminution du pH de l'eau en présence du  $\text{scCO}_2$  due à la formation d'acide carbonique a été mesurée par plusieurs auteurs estimant un pH aux alentours de 3 ce qui peut perturber fortement l'activité enzymatique due à la protonation des amines des résidus catalytiques (Toews et al., 1995 ; Niemeyer, Bright, 1998 ; Fontes et al., 2001). Plusieurs auteurs ont pu contrôler la formation d'acide carbonique par ajout de sels tels que du bicarbonate de sodium ou du phosphate de sodium ou potassium en fortes concentrations (jusqu'à 1000 mM) lors de réactions en milieu biphasique ( $\text{scCO}_2$  /

eau) permettant le maintien d'un pH assez élevé et conduisant à une amélioration significative de l'activité et/ou de la sélectivité des enzymes (Harada et al., 2009a ; Gérard et al., 2017).

A.



B.

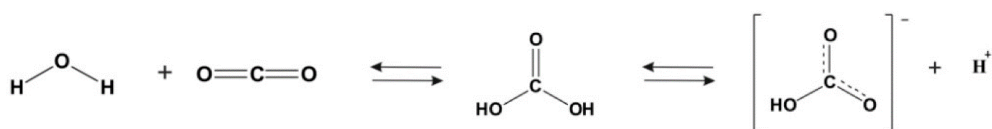


Figure 1.9 : schéma de la formation de liaisons carbamate entre la lysine en surface de l'enzyme et le CO<sub>2</sub> (A) et de la formation d'acide carbonique par dissolution de CO<sub>2</sub> dans le microenvironnement aqueux de l'enzyme (Budisa, Schulze-Makuch, 2014)

#### 1.2.4.2.3 Influence des conditions opératoires (température, pression et cycle de dépressurisation)

De nombreuses études ont utilisé le scCO<sub>2</sub> comme solvant pour les réactions enzymatiques d'estérification, d'amidation, de transestérification et de résolution énantiomérique de molécules (Smallridge et al., 2002 ; Hobbs et al., 2006 ; Liu et al., 2007 ; Hobbs, Thomas, 2007 ; Han, Poliakoff, 2012 ; Hu et al., 2015 ; Knez, 2018a ; Dias et al., 2018a). Plusieurs auteurs ont étudié la possible substitution de l'utilisation des solvants organiques par le scCO<sub>2</sub> avec dans certains cas moins d'activité mais une récupération plus simple du produit réduisant considérablement le coût associé au procédé dans sa globalité (Chulalaksananukul et al., 1993 ; Kamat et al., 1995 ; Knez, Habulin, 2002 ; Sheldon, 2012 ; 2017). Par ailleurs, la réaction de N-acylation des acides aminés sous scCO<sub>2</sub> a été très peu décrite, pour des raisons de solubilité. Lors de la catalyse enzymatique sous scCO<sub>2</sub>, il faut adapter la pression et la température afin d'ajuster la densité, diffusivité, viscosité et la polarité du solvant à l'enzyme et aux substrats utilisés de façon à éviter la dénaturation réversible ou irréversible de l'enzyme due à des températures et pressions élevées (figure 1.10). En effet, l'évolution de l'activité en fonction de la température suit une courbe en cloche dont la partie ascendante est liée à une activation thermique de la réaction et la partie descendante est liée à une dénaturation thermique de l'enzyme. L'évolution de l'activité en fonction de la pression est très différente selon la résistance des enzymes à la pression mais d'une manière générale les enzymes demeurent stables à plusieurs centaines de bars à des températures modérées (Hoang et al., 2018). Comme

évoqué plus haut, les propriétés thermo-physiques telles que la densité du  $\text{scCO}_2$  sont aussi très sensibles aux variations de la pression et de la température rendant ce solvant facilement ajustable en termes de potentiel de solubilisation des substrats et de capacité à véhiculer ces derniers vers le site catalytique de l'enzyme grâce à la très faible viscosité du mélange réactionnel favorisant les transferts de matière. La polarité du  $\text{scCO}_2$  est aussi un paramètre très important lors de la catalyse enzymatique. La constante diélectrique permet d'évaluer ce paramètre. Ce dernier évolue dans le même sens que l'évolution de la densité en fonction de la pression et de la température (Matsuda, 2013a). En effet, l'augmentation de la densité du  $\text{scCO}_2$  par l'augmentation de la pression (i.e. de 30 à 118 bar à  $50^\circ\text{C}$ ) permet d'avoir un solvant plus polaire ( $\log P$  de 0,9 à 2) et donc d'augmenter la capacité du solvant à solubiliser et à entraîner les molécules hydrophobes (N.B.  $\log P$  : le logarithme du coefficient de partition d'un solvant ou d'une molécule dans un mélange octanol / eau) (Nakaya et al., 2001).

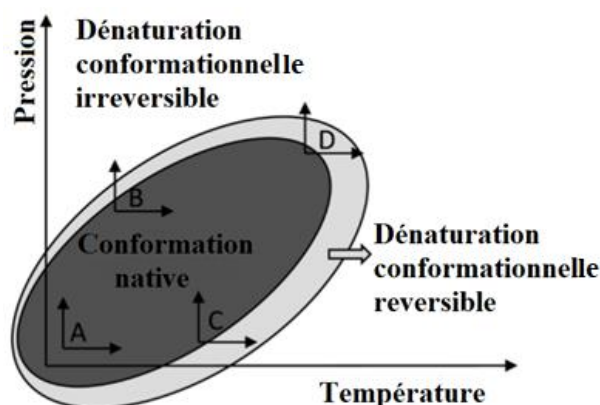


Figure 1.10 : évolution de la conformation des protéines selon la pression et la température du  $\text{scCO}_2$  utilisé, A : faible pression et température, B : faible température et pression élevée, C : faible pression et température élevée, D : pression et température élevée (Hoang et al., 2018).

L'activité et la stabilité des enzymes lors des réactions sous  $\text{scCO}_2$  est très dépendante de la structure de la lipase utilisée et des conditions opératoires (pression et température). Plusieurs auteurs ont décrit des changements importants dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme sous  $\text{scCO}_2$  conduisant soit à une amélioration ou à une perte d'activité (Monhemi, Housaindokht, 2012 ; Housaindokht et al., 2012 ; Melgosa et al., 2015 ; Peng et al., 2016). Des variations de la structure secondaire et tertiaire similaires ont été observées avec en plus une perte de compacité de l'enzyme lors des études par dynamique moléculaire du comportement de CALB sous  $\text{scCO}_2$  (Monhemi, Housaindokht, 2012 ; Housaindokht et al., 2012). Dos Santos et al. (2016) ont noté une diminution de l'activité de CALB, lors de l'estérification de l'acide oléique avec du méthanol, avec l'augmentation de la pression et de la température de  $\text{scCO}_2$ . L'analyse des spectre FTIR a montré les mêmes modifications de la structure secondaire

permettant de relier les pertes d'activité à la formation de carbamates sur l'enzyme par interaction entre des groupements amine en surface avec le CO<sub>2</sub> (Dos Santos, Rezende, et al., 2016a). Ces résultats peuvent expliquer les pertes d'activité observées par plusieurs auteurs lors de l'augmentation de la pression (Kamat et al., 1992 ; Oliveira et al., 2006). Selon ces auteurs la perte d'activité pourrait être due à l'interaction du CO<sub>2</sub> avec l'histidine présente dans le site actif de l'enzyme réduisant les interactions du substrat avec les résidus catalytiques. L'augmentation de la pression est aussi accompagnée d'une augmentation de la densité du scCO<sub>2</sub> présentant une affinité plus importante du substrat vis-à-vis du solvant limitant ainsi l'accessibilité au site actif de l'enzyme (Celia et al., 2005). Concernant l'influence de la pression sur l'activité enzymatique, plusieurs auteurs ont montré une augmentation de l'activité avec l'augmentation de la pression (Hu et al., 2015 ; Dos Santos, Zobot, et al., 2016). D'autres auteurs ont expliqué l'amélioration de l'activité enzymatique sous scCO<sub>2</sub> à faible pression, par une meilleure stabilisation du complexe enzyme/donneur d'acyle lors des réactions d'estérification (Ikushima et al., 1996). Concernant l'influence de la température, des auteurs ont décrit une augmentation de l'activité avec l'augmentation de la température jusqu'à un optimum (Oliveira et al., 2006 ; Liu et al., 2007). Liu et al. (2007) ont réalisé la réaction d'amidation de la vanillylamine avec l'acide palmitique sous scCO<sub>2</sub> avec différentes enzymes. Il a par exemple été montré que la lipase de *Mucor miehei* présentait une meilleure activité lors de l'accroissement de la température due à une amélioration du transfert du substrat vers les résidus catalytiques de l'enzyme et à une meilleure activation de la lipase avec de possibles changement conformationnels en faveur de la réaction de synthèse (Liu et al., 2007).

L'un des critères de choix d'un procédé est la facilité de réutilisation des enzymes après utilisation. De ce point de vue, le scCO<sub>2</sub> représente le solvant de choix lié à son élimination facile après la réaction par simple dépressurisation. Mais cette dernière peut nuire à l'activité enzymatique. Plusieurs auteurs ont décrit une perte d'activité progressive après recyclage de l'enzyme sous scCO<sub>2</sub>. (Oliveira et al., 2006 ; Knez et al., 2012 ; Dos Santos, Rezende, et al., 2016a ; Dos Santos, Zobot, et al., 2016). Cette perte d'activité était due soit à une dénaturation de l'enzyme par effet de cisaillement exercé lors de la dépressurisation, en particulier lors d'une dépressurisation rapide, soit à l'élimination de l'eau de la première couche de solvation de l'enzyme causant une instabilité structurale (Oliveira et al., 2006 ; Dos Santos, Zobot, et al., 2016). Habulin et al. (2007) ont mesuré par la méthode Karl-Fischer la quantité d'eau en contact avec CALB immobilisée avant et après traitement sous scCO<sub>2</sub> à 60°C et 10 MPa. Ils ont expliqué la perte d'activité enzymatique après le traitement par une réduction de la quantité

d'eau en contact avec l'enzyme qui est passée de 1,44 % à 0,88% après 24h de traitement (Habulin et al., 2007).

Ces dernières années, d'autres solvants alternatifs, dit néotériques, ont été proposés dans le domaine de la catalyse enzymatique. Ce sont les liquides ioniques (Ionic Liquide ; IL) et les solvants eutectiques profonds (Deep Eutectic Solvents ; DES).

### 1.2.5 Acylation enzymatique dans les liquides ioniques

Les liquides ioniques (ILs) sont définis comme l'association d'un cation organique avec un anion organique ou inorganique de faible masse moléculaire produisant un solvant liquide à température ambiante en raison des interactions électrostatiques, liaisons hydrogènes et de van-der-Waals entre les différents constituants (Choi et al., 2014). Ce sont des solvants non-volatiles, non-inflammables, avec une conductivité ionique élevée et une importante stabilité chimique et thermique (Vazquez et al., 2020). De plus, leur capacité de solubilisation des substrats et leur hydrophobie peuvent-être facilement contrôlées par la modification de l'un ou des deux constituants permettant d'améliorer l'activité enzymatique lors des réactions d'acylation des biomolécules (Vekariya, 2017). Etant donnée la diversité des molécules qui peuvent être utilisées, de très nombreuses combinaisons de molécules peuvent être envisagées permettant la production de solvants avec des propriétés physicochimiques variées qui peuvent être adaptées à l'application voulue comme par exemple l'extraction de molécules et la catalyse chimique ou enzymatique (Pârvulescu, Hardacre, 2007 ; Lozano, 2010a ; Olivier-Bourbigou et al., 2010 ; Qureshi et al., 2014 ; Steinrück, Wasserscheid, 2015 ; Potdar et al., 2015 ; Villa et al., 2019). La densité et surtout la viscosité du solvant sont des paramètres très importants lors de la catalyse enzymatique en modulant le transfert des substrats vers le site catalytique de l'enzyme. Les ILs présentent une densité (entre 1 et 1,6 g/cm<sup>3</sup>) et une viscosité (entre 66 et 1110 cp) assez élevées par rapport à l'eau (1cp à 20°C) et aux solvants organiques (Olivier-Bourbigou et al., 2010). Pour des réactions enzymatiques, ce problème peut être limité par l'augmentation de la température ou par l'ajout d'une certaine quantité d'eau, permettant une réduction de la viscosité et une amélioration de la flexibilité de l'enzyme (Yang, Pan, 2005 ; Husson, 2008 ; De Diego et al., 2009). L'ajout d'eau dans le milieu doit être bien contrôlé et dépendra, comme dans le cas des solvants organiques, du solvant utilisé (sa polarité), de la réaction mise en œuvre et de l'enzyme utilisée (Yang, Pan, 2005). Selon certains auteurs, l'eau présente dans le liquide ionique va former des liaisons hydrogène avec les constituants du solvant réduisant sa disponibilité pour les réactions ce qui permet de maintenir l'équilibre thermodynamique de la réaction dans le sens de la synthèse (cas des lipases) et de stabiliser la structure



tridimensionnelle active de l'enzyme en protégeant la première couche de solvation (Olivier-Bourbigou et al., 2010). Plusieurs auteurs ont comparé l'utilisation de divers solvants pour la réaction d'acylation enzymatique (estérification, transestérification et amidation) en présence de lipases telles que CALB et ont observé une activité similaire ou meilleure dans les liquides ioniques par rapport aux solvants organiques (Madeira Lau et al., 2000 ; Husson et al., 2008a ; Sheldon, 2016). Par ailleurs, la stabilité des enzymes était nettement améliorée grâce à l'effet protecteur et stabilisateur de la structure tridimensionnelle de ces solvants (Elgharbawy et al., 2018).

De nombreuses études ont utilisé les ILs pour les réactions d'acylation enzymatique (Husson et al., 2008a ; 2009a ; De Diego et al., 2009 ; Hulin et al., 2015 ; Lozano et al., 2019). La possible modulation de la polarité des ILs tout en gardant une  $a_w$  faible présente un avantage pour les réactions d'acylation de molécules hydrophiles telles que les peptide et sucres (Husson et al., 2008a ; 2009a ; Lin et al., 2015). Husson et al. (2009) ont réalisés la réaction de N-acylation du dipeptide Lys-Ser, HCl avec de l'acide oléique dans le liquide ionique  $[Bmim]^+[PF_6]^-$  et comparé les résultats de la catalyse avec ceux obtenus dans du 2-méthyl-2-butanol et en milieu fondu (acide oléique). Le liquide ionique a permis une solubilisation du dipeptide plus de 10 fois supérieure à celle obtenue dans le solvant organique passant de 1,18 à 14,05 g/L et permettant ainsi d'améliorer le taux de conversion à l'équilibre en passant de 36 à 57 % et la vitesse initiale de la réaction de 1 à 32 mM / h (Husson et al., 2009a). L'association des ILs et du  $scCO_2$  comme milieu biphasique pour la catalyse enzymatique a aussi été largement utilisée pour l'acylation des biomolécules. Ceci permet d'une part l'amélioration de l'accessibilité des substrats au site actif par implication du  $scCO_2$  et la réduction de la viscosité, et d'autre part facilite l'extraction des molécules produites qui ont une affinité avec le  $scCO_2$  (Keskin et al., 2007a ; Lozano, 2010a ; Lozano et al., 2007 ; 2011 ; Lozano, Gomez, et al., 2017 ; Villa et al., 2019).

Certains ILs sont considérés comme des solvants verts liés à leur faible volatilité et à leur recyclabilité (Yang, Pan, 2005 ; Lozano, Alvarez, et al., 2017). Cependant plusieurs auteurs ont décrit une faible biodégradabilité et une certaine toxicité vis-à-vis de certains organismes vivants. Ceci a en particulier été observé avec les ILs à base de tetra-alkyl-ammonium et de di-alkyl-imidazolium (Matzke et al., 2007 ; Coleman, Gathergood, 2010 ; Afonso, 2010 ; Oliveira et al., 2016) ce qui a stimulé la recherche dans le domaine de l'ingénierie des solvants et le développement de nouvelles générations d'ILs à base de molécules éco- et biocompatible tels que les sucres et les acides aminés (Sheldon, Woodley, 2018a). Par ailleurs, le coût de production de ces liquides ioniques par rapport aux solvants organiques (environ 240 US\$ / kg

pour le chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium à 95% pureté contre environ 30 US \$ / kg pour de l'acétone ou du toluène à 99% de pureté) ainsi que la toxicité de certains de ces ILs a représenté un frein important au développement de procédés utilisant ces milieux (Jastorff et al., 2003 ; Gorke et al., 2008a). Les solvants eutectiques profonds ou mélanges eutectiques profonds (MEP) sont une autre catégorie de solvants néotériques, dérivés des ILs, présentant des propriétés similaires à celles des ILs.

### 1.2.6 Acylation enzymatique en solvants eutectiques profonds

Les solvants eutectiques profonds (MEP, ou DES en Anglais) sont issus de l'association d'un sel organique, souvent un sel d'ammonium, formé d'une molécule cationique tel que la choline et d'un contre ion tel que les chlorures ou autres molécules anioniques, et d'un donneur de liaisons hydrogène (DLH) qui est une molécule neutre de nature très variable : sucres, acides aminés, alcools...(Durand, 2013a). Parmi ces derniers, on retrouve les solvants eutectiques profonds naturels (NADES) formés exclusivement de molécules issues de ressources naturelles (Khodaverdian et al., 2018). Nombre de ces NADES ont été identifiés dans des matrices biologiques et décrits comme impliqués dans leur mécanisme de synthèse, de solubilisation et de stockage de molécules peu solubles dans l'eau (Choi et al., 2011 ; Dai et al., 2013 ; Vanda et al., 2018). Ce sont des solvants considérés comme verts et éco-compatibles en raison de leur origine naturelle, leur bonne biodégradabilité, leur faible volatilité et leur faible toxicité par rapport aux solvants organiques (Zhao et al., 2013a ; Hayyan et al., 2012 ; 2014). La toxicité des MEP dépend énormément de la nature de leurs constituants (Juneidi et al., 2018). Comme les molécules utilisées pour leur préparation sont très disponibles et leur méthode de production simple par rapport aux liquides ioniques, les MEP et en particulier les NADES présentent un avantage important en vue d'une extrapolation de leur utilisation à l'échelle industrielle dans plusieurs domaines tels que l'extraction de molécules, la catalyse chimique et enzymatique, la capture de molécules volatiles, ... (Juneidi et al., 2018 ; Cunha, Fernandes, 2018 ; Pätzold et al., 2019 ; Gotor-Fernández, Paul, 2019 ; Mena-García et al., 2019). Leur production se fait par la mise en contact des constituants, initialement sous forme solide sous agitation, à une température donnée (i.e. 60°C pour les MEP formés de chlorure de cholinium / urée ou glycérol) pendant un certain temps (i.e. 2 h). Durant ce temps, un réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires stables se forme entre le sel d'ammonium et le DLH conduisant à une diminution de l'énergie du système, se traduisant par une réduction considérable de la température de fusion selon les constituants définissant ainsi le point eutectique qui correspond à cette température (i.e de 247 °C et 133 °C pour la choline chloride et urée, respectivement, à

12 °C pour le mélange des deux) (figure 1.11). Cela conduit à la production d'un solvant liquide à température ambiante ou à une température très inférieure à la température de fusion de chacun des constituants (Abbott et al., 2003). Les propriétés physiques (densité, viscosité, température de fusion, conductivité, ...) et physicochimiques (pH, polarité, ...) sont très variables et dépendent de la nature du sel cationique, du contre ion anionique et du DLH ainsi que du ratio molaire du donneur et de l'accepteur de liaison hydrogène. La polarité de ces solvants présente un avantage très important permettant la solubilisation de substrats hydrophiles et ainsi d'envisager leur utilisation pour les réactions enzymatiques avec les lipases, grâce à leur faible teneur en eau (Durand et al., 2015a ; Juneidi et al., 2018 ; Pätzold et al., 2019 ; Gotor-Fernández, Paul, 2019). D'autres types de DES constitués de sels de phosphonium ont aussi été développés mais ces derniers présentent une toxicité très importante par rapport aux MEP à base de sel d'ammonium (Hayyan, Hashim, Al-Saadi, et al., 2013).

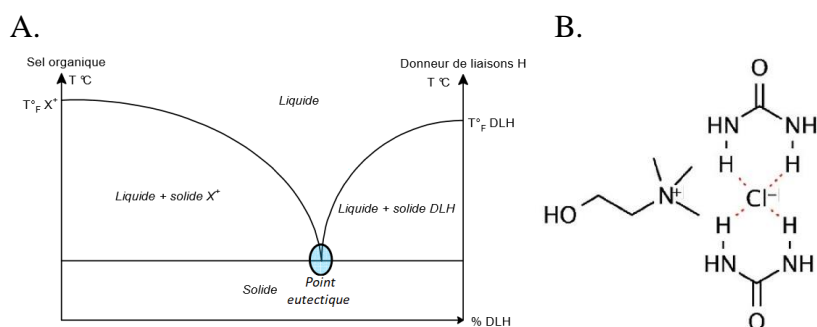


Figure 1.11 : Schéma du diagramme de phase d'un mélange eutectique (A) et un exemple d'interaction hydrogène possible dans le MEP chlorure de cholinium / urée (B) (Pätzold et al., 2019)

### Paramètre influençant la biocatalyse en solvant eutectique profond :

Plusieurs auteurs ont utilisé les MEP pour la réaction d'acylation enzymatique de molécules hydrophiles dans une perspective de développement de procédés enzymatiques pour les réactions de lipophilisation par alcoolyse, amidation ou estérification (Zhao et al., 2013a ; Durand et al., 2013 ; Hayyan et al., 2014 ; Kleiner et al., 2016 ; Pätzold et al., 2019). Gorke et al. (2008) ont décrit pour la première fois la possible utilisation des MEP pour les réactions enzymatiques. Ils ont décrit de meilleures performances de CALB pour la réaction de transestérification de l'éthyle valérate avec du butanol en présence des MEP chlorure de cholinium (ChCl):urée (U) et glycérol (Gly) par rapport à d'autres liquides ioniques utilisés. Ils ont aussi démontré que l'enzyme reste active malgré la présence de l'urée et des chlorures de cholinium qui sont considérés comme des agents dénaturants de l'enzyme, s'ils sont pris séparément. Mais la présence d'un réseau d'interactions hydrogène stables entre les DLH et le

sel d'ammonium utilisé permet de protéger la structure de l'enzyme induisant aussi une forte polarité du MEP (Gorke et al., 2008a). Hammond et al. (2016) ont étudié de façon très précise les interactions qui régissent la formation des MEP en utilisant la diffraction des neutrons en prenant comme exemple le MEP ChCl:U. Ils ont confirmé la formation d'un réseau fort et complexe d'interactions hydrogène entre les trois constituants du mélange (l'urée, la choline et le chlorure) prévenant ainsi la cristallisation du mélange à température ambiante (Hammond et al., 2016). Monhemi et al. (2014) ont étudié l'influence de ce MEP sur la structure de CALB par modélisation moléculaire et comparé les résultats avec ceux obtenus en présence de l'urée et de l'eau. Les auteurs ont décrit un effet protecteur de la formation du réseau d'interactions hydrogène au sein du mélange prévenant la pénétration des constituants du MEP à l'intérieur de la structure de l'enzyme, ce qui aurait causé la dénaturation de l'enzyme en perturbant les liaisons hydrogène intermoléculaires en particulier en présence de l'urée. D'autre part, une forte stabilité thermique de l'enzyme a été observée due à une stabilisation de la structure tridimensionnelle exercée par ce réseau de liaisons hydrogène (Monhemi et al., 2014). Zeng et al. (2016) ont aussi rapporté une stabilisation de la structure du lysozyme placé dans le solvant eutectique bétaïne:urée protégeant la conformation de l'enzyme contre l'effet dénaturant de l'urée en se basant sur les analyses par dichroïsme circulaire (Zeng et al., 2016). Ils ont aussi démontré l'importance d'équilibrer le ratio molaire des constituants afin d'avoir une bonne synergie entre eux et d'éviter leur effet négatif sur la structure des protéines. Khodaverdian et al. (2017) ont décrits une meilleure stabilité thermique de la laccase en présence du MEP bétaïne:glycerol (ratio 1:2) et bétaïne:sorbitol:eau (ratio 1:1:1). Ils ont aussi observé une stabilisation de la structure 3D de l'enzyme en présence de ces MEP mais l'utilisation du MEP bétaïne:acide malique:eau (ratio 1:1:1) a conduit à la dénaturation de l'enzyme démontrant l'importance du choix du donneur de liaison hydrogène (Khodaverdian et al., 2018). Durand et al. (2012) ont réalisé la réaction de transestérification du laurate de vinyle avec différents alcools dans des MEP avec différents DLH. Les meilleures performances de CALB ont été obtenues dans les MEP ChCl:U et ChCl:Gly. L'utilisation d'autres DLH tels que les acides dicarboxyliques et l'éthylène glycol a montré l'apparition de produits secondaires, rentrant en compétition avec le donneur d'acyle ce qui réduit les performances de la réaction (Durand et al., 2012a). En effet, la réactivité du DLH est l'un des paramètres les plus importants qui peut nuire à la bonne mise en œuvre des réactions enzymatiques dans les MEP. La possible réactivité des constituants du MEP en présence des enzymes a été exploitée par certains auteurs en utilisant le MEP comme solvant et substrat de la réaction en même temps. C'est le cas de l'étude décrite par Siebenhaller et al. (2016) qui ont pu réaliser la réaction d'estérification de plusieurs

sucres avec différents acides gras eux même constituant du MEP utilisé pour la production de glycolipides (Siebenhaller et al., 2016).

D'autres paramètres peuvent aussi influencer les réactions enzymatiques en MEP tels que le choix du contre ion, la présence d'eau, le pH et les propriétés thermo-physiques du solvant. Zhao et al, (2013) ont réalisé la réaction de transestérification de l'huile de soja avec du méthanol dans des MEP à base de cholinium avec différents contre-ions (chlorure et acétate) et de glycérol comme DLH à différents ratios molaires à 50°C et en présence de différentes lipases. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant CALB immobilisée dans le MEP chlorure de cholinium / glycérol à un ratio molaire de 1:2 (Zhao et al., 2013a). Durant et al. (2013) ont réalisé la réaction d'alcoololyse pour la production d'ester phénolique dans des mélanges eutectiques constitués de chlorure de cholinium (ChCl) comme sel d'ammonium et l'urée (U) ou le glycérol (Gly) comme donneur de liaison hydrogène à un rapport molaire de 1:2 et en utilisant CALB immobilisée. Ils ont pu améliorer l'activité enzymatique par ajout jusqu'à 10% massique d'eau dans le milieu réactionnel grâce à une meilleure solvation de l'enzyme et une réduction de la viscosité du milieu, ce qui a permis une meilleure flexibilité structurale de CALB et surtout un meilleur transfert de matière (Durand et al., 2013). Par ailleurs, l'ajout d'une quantité trop élevée d'eau change l'équilibre thermodynamique de la réaction vers une réaction d'hydrolyse. D'autres phénomènes pourraient expliquer cette augmentation de l'activité tels que l' $a_w$  et le pH du milieu réactionnel. Par exemple, après ajout de 20% massique d'eau, une très faible augmentation de l' $a_w$  de 0 à 0,065 a été observée dans le cas du ChCl:Gly alors qu'une augmentation plus forte de l' $a_w$  de 0,02 à 0,4 a été observée dans le cas du ChCl:U avec lequel une  $a_w$  entre 0,15 et 0,2 était atteinte après ajout de 8 à 10% d'eau (Durand et al., 2013). Certains auteurs ont exploité cette caractéristique lors de leurs réactions d'estérification. Xu et al. (2017) ont réalisés la réaction d'estérification du glycérol avec des acides gras polyinsaturés (n-3) dans le MEP ChCl:U en comparaison avec la réaction en milieu fondu en présence de CALB. Ils ont observé une amélioration de l'activité enzymatique dans le MEP reliée au fait que l'eau produite lors de la réaction était piégée par le solvant au fur et à mesure de sa production permettant de maintenir l'équilibre thermodynamique de la réaction dans le sens de la synthèse de produit (Xu et al., 2017). En ce qui concerne le pH, une faible évolution de 8,5 à 7,5 a été observée dans le cas du ChCl:U ce qui pourrait influencer l'état d'ionisation des résidus d'acides aminés de l'enzyme mais aucun changement du pH n'a été enregistré dans le MEP ChCl:Gly qui est resté à un pH d'environ 4 (Durand et al., 2013).

## Chapitre I : Étude bibliographique

L'importance de l'ajout de l'eau à environ 8% a aussi été décrite par d'autres auteurs (Guajardo et al., 2017). Ces auteurs ont réalisés la réaction d'estérification du glycérol avec de l'acide benzoïque en présence de CALB et dans différents MEP (ChCl:U, ChCl:Gly, ChCl:ETA (éthylène glycol) à un ratio molaire de 1:2 et du MA (chlorure de méthyl-ammonium):Gly à un ratio molaire de 1:3). La meilleure activité (99% de conversion) a été observée dans du ChCl / Gly après ajout de 8% massique d'eau. Ces résultats ont été expliqués par une très importante baisse de la viscosité du milieu réactionnel après ajout de l'eau ce qui réduit considérablement les limitations de transfert du solvant à l'enzyme (tableau 1.3) (Guajardo et al., 2017). Ils ont aussi enregistré une très bonne stabilité de l'enzyme après la première utilisation. L'augmentation de la température réduit aussi considérablement la viscosité des MEP. Abbott et al. (2003) ont noté une diminution d'environ 10 fois de la viscosité du MEP ChCl : U en passant de 20°C à 50°C (Abbott et al., 2003). De même, Durand et al. (2012) ont observé une augmentation d'environ 1,5 fois l'activité de CALB dû à la réduction de la viscosité suite à l'augmentation de la température de 40 °C à 60 °C en réalisant la réaction de transestérification du laurate de vinyle avec l'octanol dans les MEP ChCl : U et ChCl : Gly. Par ailleurs, aucune étude sur la N-acylation enzymatique d'acides aminés dans les MEP n'a été rapportée.

Tableau 1-3 : évolution de la viscosité des MEP après ajout de 10% v/v d'eau (Guajardo et al., 2017)

Solvant	Viscosité [cP]			
	ChCl:U	ChCl:ETA	ChCl:Gly	Glycérol
Solvant pur	1602	52	469	1490
Solvant avec 10 % v /v d'eau	3	19	90	320

La principale problématique lors du développement des procédés d'acylation enzymatique de substrats avec un écart important de polarité tels que les acides aminés avec les acides gras est la difficulté de mettre en contact les deux molécules avec l'enzyme en même temps liée à la faible solubilité de l'un des deux, en particulier les acides aminés dans les solvants apolaires (solvants organique et scCO<sub>2</sub>). L'utilisation des solvants de nouvelle génération tels que les ILs et les MEP peut permettre de faire face à ces problématiques de solubilité à condition de tenir compte des risques de toxicité ou de réactions secondaires présents dans certains cas en adaptant le choix des constituants et des paramètres de mise en œuvre des procédés aux réactions et aux enzymes utilisées. Le développement de ce type de solvants étant assez récent, les phénomènes qui régissent les interactions au sein de ces derniers ne sont pas encore complètement élucidés. A part les lipases, d'autres types d'enzymes telles que les acylases sont capables de réaliser les réactions d'acylation d'acides aminés. Elles ont été décrites pour catalyser ces réactions en milieux aqueux.

### 1.3 Réaction d'acylation enzymatique en milieu aqueux

#### 1.3.1 Enzymes catalysant la réaction d'acylation en milieu aqueux

L'acylation des acides aminés et peptides en milieux aqueux peut être assurée par des enzymes appartenant à différentes familles telles que les acyl-transférases (EC 2.3.1), les carboxylesterases (EC 3.1.1) et les amidohydrolases (EC 3.5.1). Ces dernières appelées communément aminoacylases sont capables de réaliser la réaction de N-acylation/déacylation des molécules dans des milieux aqueux (annexe 4). En général, les milieux tamponnés sont utilisés pour ces réactions afin de pouvoir contrôler et maintenir le pH stable lors de la réaction. Plusieurs aminoacylases provenant de différentes espèces vivantes (microorganismes, champignons, animaux, plantes, ...) ont été décrites dans la littérature. Du point de vue réactionnel, elles sont caractérisées par des chimio-, régio- et énantio-sélectivités différentes. La plupart d'entre elles sont très spécifiques et catalysent la réaction avec un substrat particulier mais certaines ont un spectre d'action beaucoup plus large telles que les aminoacylases I et les N-acyl-D-amino-acide déacylase. *In vivo*, étant donné que tous les organismes sont constitués de phase aqueuse en majorité, ces enzymes interviennent dans plusieurs mécanismes naturels tels que le catabolisme des acides aminés acylés issus du catabolisme des protéines et des peptides (Story et al., 2001). La N-succinyl-L-glutamate amidohydrolase est l'une des enzymes clé dans le catabolisme de l'arginine chez certaines espèces intervenant à la fin de la voie de production du glutamate et de l'acide succinique (Wauven, Stalon, 1985 ; Lu, 2006). L'aspartoacylase est très présente dans le système nerveux central intervenant dans la régulation de la concentration de l'acide N-acétyl-aspartique. Plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie de Canavan sont associées à la diminution de l'activité de cette enzyme (Kots et al., 2019). Les aminoacylases III ont aussi été décrites comme impliquées dans la neurotoxicité du 4-hydroxy-2-nonal intervenant dans la progression de certaines maladies neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson) (Tsirulnikov et al., 2012). D'autres acylases sont utilisées comme moyens de défense contre les attaques bactériennes. Certains animaux et plantes sécrètent des enzymes appartenant au groupe des acyl-homoserine-lactone acylases (AHL) permettant de dégrader les molécules (homosérine lactone) qui interviennent dans la régulation de l'expression de gène de virulence de microorganismes pathogènes (quorum sensing). Cela permet d'envisager l'utilisation de ces enzymes dans la prévention de la virulence des bactéries pathogènes (Lin et al., 2003 ; Kalia, 2014). En dehors des AHL, certaines pénicillines acylases présentent aussi cette activité biologique (Mukherji et al., 2014 ; Sunder et al., 2017). Les pénicillines acylases sont parmi les enzymes les plus caractérisées et

les plus utilisées en industrie pharmaceutique. Découvertes en 1950 par Sakaguchi et Murao, elles sont produites par plusieurs microorganismes (bactéries, champignons et levures) (Tishkov et al., 2010). Elles sont largement utilisées à l'échelle industrielle pour la production d'antibiotiques semi-synthétiques. Elles hydrolysent la liaison amide entre l'acide carboxylique et l'acide 6-aminopénicillanique de la pénicilline G pour la pénicilline G acylase (PGA) représentant environ 85% de la production (équivalent à environ 7650 tonnes/an) et de la pénicilline V pour la pénicilline V acylase (PVA) englobant les 15% restants (Arroyo et al., 2003 ; Spence, Ramsden, 2007).

D'un point de vue structural, les acylases présentent une diversité très importante. On y trouve des enzymes monomériques et homo-multimériques telles que les aminoacylases I, II et III formées d'une ou de plusieurs sous-unités identiques et hétérodimériques comme les pénicillines acylases formées d'une grande et d'une petite sous-unité. D'autre part, deux superfamilles peuvent être retrouvées selon la présence (métalloenzyme) ou l'absence (N-terminal nucléophile hydrolase ou Ntn hydrolase) d'ion métallique au niveau de l'enzyme.

La superfamille des Ntn hydrolases regroupe en particulier les pénicillines acylases, les homosérines lactone acylases et les céphalosporines acylases. Ces dernières présentent de faibles homologues de séquence mais une organisation structurale en feuillets  $\alpha\beta\beta\alpha$  identiques (Avinash et al., 2016). Ces enzymes deviennent actives après le clivage du peptide N-terminal, faisant apparaître l'acide aminé catalytique (sérine, thréonine ou cystéine), responsable de l'hydrolyse de la liaison amide (Lodola et al., 2012). Ce résidu nucléophile N-terminal est différent selon le type d'enzyme (la sérine pour PGA et la cystéine pour PVA) (Avinash et al., 2016). Les enzymes appartenant à cette famille présentent un mécanisme catalytique similaire (Figure 1.12). Dans le cas de PGA, le mécanisme catalytique commence par l'attaque nucléophile du groupement hydroxyle de la sérine catalytique (Ser $\beta$ 1) sur le carbone du groupement carbonyle de la liaison amide. Ce dernier est stabilisé par la formation de liaisons hydrogènes avec les acides aminés du trou oxyanionique (Asn $\beta$ 241 et Ala $\beta$ 69) conduisant à un état de transition tétraédral. La disparition de cet état de transition tétraédral s'accompagne de la libération de l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) permettant la formation de l'acyle enzyme. S'ensuit une attaque nucléophile soit par l'eau dans le cas de l'hydrolyse ou une autre amine dans le cas de la synthèse (formation d'une liaison amide). Cette étape permet de libérer l'enzyme et le deuxième produit (dans ce cas acide phénylacétique). Toutes ces étapes sont réversibles, ce qui permet d'envisager une synthèse avec ces enzymes en changeant les



conditions réactionnelles (faible activité d'eau et pH acide) (Srirangan et al., 2013 ; E. Hassan, 2016).

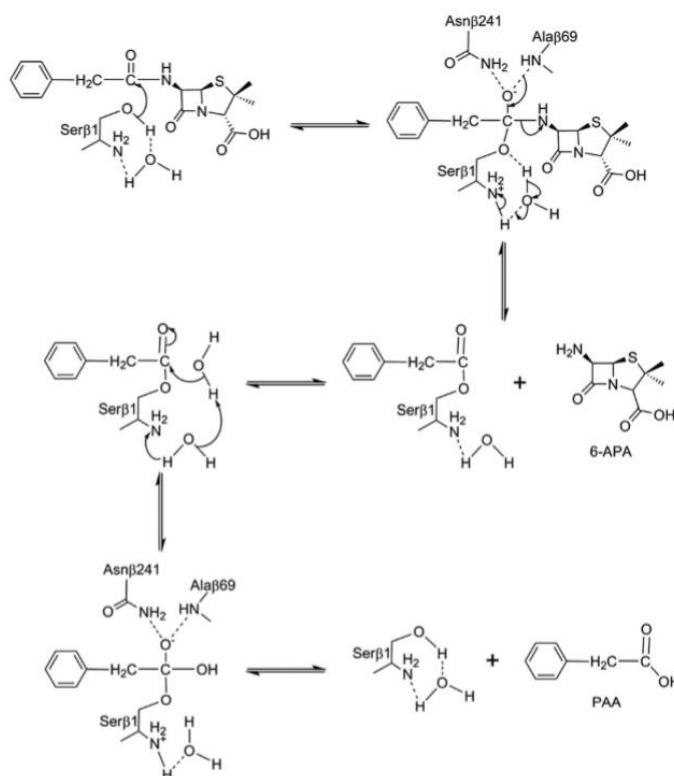


Figure 1.12 : mécanisme catalytique de la pénicilline G acylase (Srirangan et al., 2013)

La deuxième superfamille d'enzymes appartient aux métalloprotéases et englobe principalement les aminoacylases I, II et III. Ces dernières nécessitant la présence d'un ou deux ions métalliques divalents, principalement du  $Zn^{2+}$  qui peut être remplacé par du  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  (Henseling, Rohm, 1988). L'implication de la présence du  $Zn^{2+}$  dans l'activité et la stabilité structurale de l'enzyme a été étudiée par plusieurs auteurs. Dans le cas de l'aminocyclase I du rein porcine, il a été démontré sur la base de l'étude par relaxation magnétique nucléaire et par dichroïsme circulaire que le  $Zn^{2+}$  permet une stabilisation de la structure active de l'enzyme sans intervenir dans l'interaction enzyme/substrat ou sur les performances catalytiques de l'enzyme (Heese et al., 1990 ; Tang et al., 1995). D'autres auteurs ont montré l'implication du zinc dans le processus catalytique d'une aminoacylase I humaine contenant deux atomes de zinc au niveau du site actif (Lindner et al., 2003). Dans le cas de l'aspartocyclase humaine, le zinc joue un rôle dans le mécanisme catalytique. Cette enzyme est une protéine homodimérique de 36 kDa dont le site actif est situé au fond d'une cavité profonde et étroite dans chacune des sous unités. La présence d'acides aminés chargés positivement à l'entrée de la cavité permet une meilleure attraction de molécules chargées négativement. Elle est formée de trois régions dont (Kots et al., 2019):

- une région de coordination de la molécule d'eau catalytique avec le  $Zn^{2+}$ ,
- une région de fixation et de stabilisation du substrat avec implication de plusieurs acides aminés (Arg168, Asn70, Arg71 et Tyr288)
- une base catalytique (Glu178) qui joue le rôle d'accepteur de proton de la molécule d'eau catalytique

Dans ce cas, le groupement carbonyle de la molécule polarisée par l'Arg63 est attaqué par le groupement hydroxyle activé (figure 1.13.A). L'oxygène chargé négativement formé est stabilisé par des interactions électrostatiques avec l'Arg63 et le  $Zn^{2+}$  (figure 1.13.B). Cela permet par la suite la libération de l'acide aspartique et le retour à l'état initial, après la récupération du proton cédé par le Glu178 par la molécule formée (Bitto et al., 2007). Dans le cas de l'aminocyclase I de rein porcine, c'est le Glu146 qui joue le rôle de base catalytique. Afin de contrôler et d'orienter l'équilibre thermodynamique de la réaction vers la synthèse ou l'hydrolyse, un changement des conditions opératoires (pH, température,  $a_w$ ,...) peut être nécessaire (Wardenga et al., 2010)

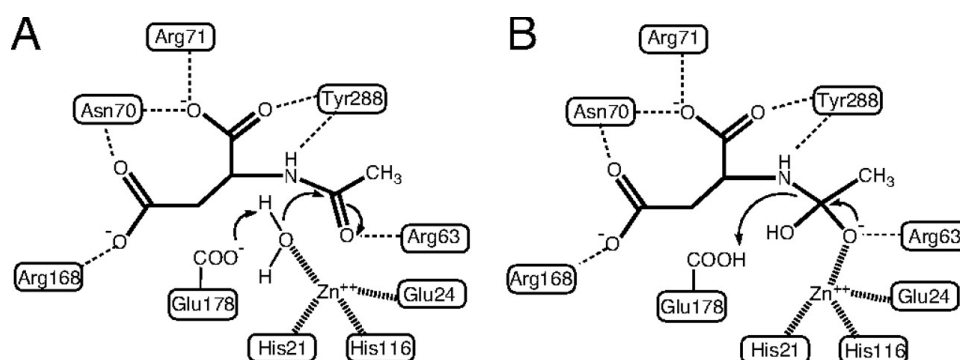


Figure 1.13 : mécanisme catalytique de l'aspartocyclase (Bitto et al., 2007)

Les aminoacylases ont été étudiées depuis longtemps d'un point de vue structural et pour leur activité hydrolytique de liaisons amides, mais beaucoup moins pour leur activité de synthèse en particulier pour la N-acylation d'acides aminés.

### 1.3.2 Influence des conditions opératoires sur les performances catalytiques des acylases

Les aminoacylases sont des enzymes principalement hydrolytiques, comme décrit précédemment, mais il est possible de changer l'équilibre thermodynamique vers la réaction d'acylation en changeant les conditions expérimentales suivant le principe de le Chatelier.

Afin de déplacer l'équilibre thermodynamique vers une réaction de synthèse plusieurs stratégies peuvent être adoptées.

- ❖ L'utilisation de solvants organiques comme milieu réactionnel dans un but de réduire l'activité de l'eau. Mais comme pour l'acylation avec les lipases, les substrats hydrophiles (acides aminés) sont difficilement solubilisés dans ces systèmes réactionnels (Kosáry et al., 1992 ; 1994 ; Youshko et al., 2001). Certains auteurs ont évalué l'utilisation des milieux biphasiques afin de favoriser la réaction d'acylation des acides aminés avec les aminoacylases I de rein porcin (Ferjancic-Biagini et al., 1997 ; Wada et al., 2002). Wada et al. (2002) ont évalué l'utilisation de plusieurs co-solvants pour la réaction de synthèse de l'acide N-lauroyl-L-glutamate. Parmi ces derniers, le glycérol à différents pourcentages, selon l'acide aminé utilisé, a permis une augmentation importante de l'activité de synthèse passant jusqu'à environ 30 fois l'activité initiale. Cela a été attribué à la diminution de la constante diélectrique du milieu qui, dans ce cas, a favorisé la réaction de synthèse (Wada et al., 2002). Par ailleurs, ce n'est pas le cas de toutes les aminoacylases. Koreishi et al. (2005a) ont utilisé le même système (70% de glycérol) pour la réaction de synthèse avec l' aminoacylase de *Streptomyces mobaraensis*. Ils ont noté une perte du taux de conversion d'environ 15 fois en présence de glycérol. Cela est probablement lié à une diminution de la flexibilité interne de l'enzyme à cause de la diminution de la constante diélectrique du solvant réactionnel et de la faible quantité d'eau libre présente autour de l'enzyme (Koreishi et al., 2005a).
- ❖ L'utilisation de tampon comme milieu réactionnel mais avec une modification des conditions opératoires (pH et/ou de la température, concentration élevée de substrats, ...) (tableau 1.4).

### 1.3.2.1 Influence du pH

Le pH du milieu réactionnel est un paramètre crucial dans les réactions de synthèse avec les aminoacylases. Il joue un rôle important, d'une part, sur l'état d'ionisation et la solubilité des substrats et, d'autre part, sur l'activité enzymatique. L'influence sur l'activité enzymatique peut être reliée à l'état d'ionisation des résidus d'acides aminés de l'enzyme impliqués dans l'interaction ou la stabilisation du substrat ainsi que celui des résidus catalytiques (Torres-Guzmán et al., 2001). Par exemple, dans le cas de l' aminoacylase I de rein porcin, étant donné que l'acide aminé catalytique a un caractère acide (acide glutamique), l'enzyme a une activité synthétique à pH acide (pH 6) et hydrolytique à pH supérieur à 7,5 (passage de l'acide carboxylique d'un état protoné à déprotoné) (Wardenga et al., 2010). Cependant, ce n'est pas

le cas de toutes les aminoacylases qui peuvent être actives dans des gammes de pH variables pour diverses réactions de synthèse (tableau 1.4).

### 1.3.2.2 Influence de la température

La gamme de température optimales dépend de l'environnement de l'organisme source, de la composition en acides aminés et de la structure des aminoacylases. Par exemple, il a été démontré par homologie de structure, dans le cas de la PGA, que la présence d'une quantité moins importante d'acide glutamique et aspartique et plus importante d'arginine et de proline permettait d'avoir une meilleure thermostabilité enzymatique (Singh, Goyal, 2014). Mais cela est très variable entre les différentes enzymes (tableau 1.4).

### 1.3.2.3 Influence des coactivateurs métalliques et inhibition de l'activité enzymatique

L'utilisation d'ion métallique pour augmenter les performances catalytiques des acylases a été décrite dans plusieurs travaux. Le fait que certaines aminoacylases appartiennent à la famille des métalloprotéases peut nécessiter la présence d'un ion métallique divalent,  $Zn^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  en général, au niveau de la structure. Ce type d'élément peut aussi permettre une meilleure stabilité de l'enzyme et une augmentation de l'activité de cette dernière. D'autre part, l'utilisation de molécules chélatrices de métaux telles que l'EDTA ou le 1.10-phénanthroline conduit automatiquement à une perte partielle ou totale de l'activité (Koreishi et al., 2009a ; 2009b ; 2006a ; 2005a ; Takakura, Asano, 2019). Par ailleurs, l'utilisation excessive de ces derniers peut aussi conduire à une altération de l'activité enzymatique (Koreishi et al., 2005b). Dans certains cas, l'enzyme est inhibée par les substrats ou les produits de la réaction. Koreishi et al. (2005b) ont montré, dans le cas de la synthèse du N- $\epsilon$ -lauroyl-L-lysine avec l'épsilon lysine acylase de *S. mobaraensis*, que l'acide gras utilisé avait un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique. En effet, un ajout progressif de ce dernier en mode fed-batch a permis une augmentation du taux de conversion comparativement au mode batch et ainsi permis d'atténuer l'effet inhibiteur observé. La même observation a été rapportée par Wada et al. (2002) lors de la synthèse du lauroyl-glutamate. Le produit de la réaction peut aussi avoir un effet inhibiteur. C'est le cas de l'acide 6-amino-penicillanique et de l'acide phénoxyacétique produit de la réaction d'hydrolyse de la pénicilline V, décrits respectivement comme des inhibiteurs non-compétitifs et compétitifs de la pénicilline V acylase de *S. mobaraensis* (Zhang et al., 2007).

Chapitre I : Étude bibliographique

Tableau 1-4 : caractéristiques et spécificités de différentes aminoacylases

Nom	Classe	Structure	Taille (kDa)	Cofacteurs	Inhibiteurs	Conditions réactionnelles	Conditions optimales	Stabilité	Spécificité	Références
Aminoacylases (SmAA) de <i>S. mobaraensis</i>	Peptidases M20 (EC 3.5.1.14)	Monomère	55	Zn <sup>2+</sup> / Ni	1.10-phenanthroline	Tampon H : pH 7,5, 37°C	H : pH : 7-8, 50°C	1 h à 45°C pH 7,5	H : N-α-acyl-AAs	(Koreishi et al., 2009b)
Aminoacylase de <i>S. mobaraensis</i>			100	Co <sup>2+</sup>		Tampon H : pH 7,5, 37°C S : pH 7,2, 37°C	H: pH : 5,5-7,5, 60°C	1 h à 60°C pH 7,2	H et S : N-α-acyl-AAs H: Céphalosporine	(Koreishi et al., 2005a)
ε-lysine acylase de <i>S. mobaraensis</i> (Sm-ELA)			Amidohydrolase metallo-dépendante, type YtcJ (EC 3.5.1.17)	56	Zn <sup>2+</sup> / Co <sup>2+</sup>	1.10-phenanthroline et l'AG (haute concentration)	Tampon H : pH 8, 37°C S : pH 7, 45°C	H : pH 8-9, 55°C	1 h à 50°C pH 8	H et S : N-ε-acyl-lysine
Aminoacylase I du rein porcin	Amidohydrolase metallo-dépendante (EC 3.5.1.14)	Homo-dimère	45	Zn <sup>2+</sup>	N.R.	Tampon S: pH 6, 37°C	S: pH 6, 37°C	N.R.	S : N-acyl-L-methionine	(Ferjancic-Biagini et al., 1997)
						Glycérol + 12.5% tampon S : pH 7,5, 37°C	S: pH 7,5, 37°C	N.R.	S : N-acyl-AAs	(Wada et al., 2002)
Aminoacylase de <i>Burkholderia sp.</i>		Homo-octamère	42	Zn <sup>2+</sup> / Co <sup>2+</sup>	EDTA	Tampon H : pH 10, 50°C S : pH 9, 25°C	H : pH 12, 70°C, S : pH 9	1 h 70°C pH 8 (pH 5 -12)	H et S : N-α-lauroyl-L-AAs	(Takakura, Asano, 2019)
Penicilline V acylase de <i>S. mobaraensis</i>	β-lactam acylase (EC 3.5.1.11)	Hétéro-dimère	19 + 61	Co <sup>2+</sup>	Acide 6-amino-penicillanique et acide phenoxyacétique	Tampon H : pH 7,8, 37°C S : pH 7,5, 45°C, 0,5 mM CoCl <sub>2</sub>	55°C pH 7,5-8,5	1 h à 55°C pH 7,8	H : β-Lactam et Capsaïcine H et S : N-lauroyl-AAs	(Koreishi et al., 2006a ; 2007a ; Zhang et al., 2007)

N.R. : non rapporté, H : réaction d'hydrolyse, S : réaction de synthèse, AG : acide gras

### 1.3.3 Acylation enzymatique d'acides aminés par les aminoacylases en milieu aqueux

Plusieurs enzymes ont été décrites comme étant capables de réaliser la réaction de N-acylation en milieu aqueux mais très peu de travaux ont été rapportés pour l'acylation d'acides aminés (tableau 1.4). Elles peuvent être regroupées en trois grands groupes : les pénicillines amidases (EC 3.5.1.11), les aminoacylases I (EC 3.5.1.14) et les N<sup>6</sup>-acyl-L-lysine amidohydrolases (EC 3.5.1.17). Les premières études d'acylation enzymatique d'acides aminés dans l'eau ont été réalisées à partir d'aminacylases de *S. mobaraensis* identifiées par l'équipe de Koreishi (Koreishi et al., 2005b ; 2006a ; 2005a ; 2009b) mais d'autres aminoacylases provenant d'organismes différents ont aussi été caractérisées.

#### 1.3.3.1 Les pénicillines acylases (EC 3.5.1.11)

Les enzymes appartenant à cette classe sont largement utilisées pour la production de dérivés de pénicilline par des réactions d'hydrolyse et de synthèse de liaison amide entre l'acide 6-aminopénicillanique et un donneur d'acyle. Certains auteurs se sont intéressés à la réaction d'acylation d'acides aminés par l'utilisation de ces enzymes. Koreishi et al., 2006 ont identifié la présence d'une enzyme hétérodimérique de 61 et 19 kDa chez *S. mobaraensis* en comparant l'activité hydrolytique de la capsäicine de différentes espèces de *Streptomyces*. Cette enzyme a été identifiée comme une pénicilline V acylase (Sm-PVA) appartenant aux  $\beta$ -lactam acylases, présentant une activité hydrolytique vis-à-vis d'acides aminés et de peptides acylés en plus de la Penicilline V, du NIPOAB (acide 2-Nitro-5-phenoxyacetamide benzoïque) et de la Penicilline G ainsi qu'une absence d'activité vis-à-vis de l'ampicilline et de la céphalosporine C (Zhang et al., 2007). Une activité acyl-transférase a aussi été identifiée (Koreishi et al., 2007a). L'enzyme avait un pH optimal d'environ 8 et une température optimale de 55°C avec une activité et une stabilité supérieure en présence de Co<sup>2+</sup>. Elle est capable de réaliser la réaction d'acylation de différents acides aminés (figure 1.14) et de peptides en présence de 78% (v/v) de glycérol. Le meilleur taux de conversion a été obtenu en présence de lysine, pré-acylée sur l'amine en position  $\epsilon$ , pour accroître la solubilité du produit dans les conditions réactionnelles (Koreishi et al., 2006a).

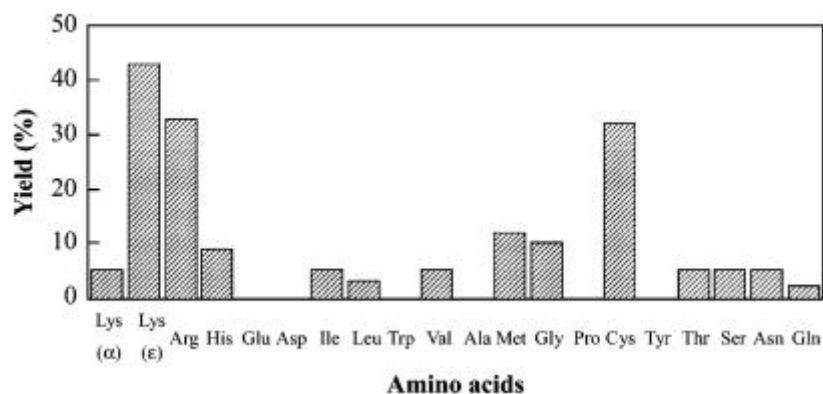


Figure 1.14 : taux de synthèse des acides aminés N-lauroylés. Conditions réactionnelles : acide laurique (7,5 mM), acides aminés (200 mM), 10 unités/mL de l'extrait de *S. mobaraensis* dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,5 contenant 0.5 mM CoCl<sub>2</sub> et 78% de glycérol à 37°C durant 2 jours (Koreishi et al., 2006a)

### 1.3.3.2 L'epsilon lysine acylase (EC 3.5.1.17)

Décrites pour la première fois en 1957 (Paik et al., 1957), les enzymes de cette classe sont capables de réaliser la réaction d'acylation en milieu aqueux de l'amine de la L-lysine en position  $\epsilon$  avec la même régiosélectivité que les lipases (CALB,...) en solvants organiques : ceci représente un avantage important. Koreishi et al., (2005b et 2009a) ont décrit les performances de l'epsilon lysine acylase de *S. mobaraensis* (Sm-ELA). C'est une métalloenzyme monomérique de 56 kDa avec des pH et température optimaux respectivement de 8 et 55°C avec une amélioration de l'activité en présence de CoCl<sub>2</sub>. La réaction de N-acylation de la lysine en position  $\epsilon$  a pu être réalisée en présence de donneurs d'acyles linéaires ou cycliques avec une préférence pour les acides gras aliphatiques. L'étude de l'influence de la longueur de la chaîne carbonée a montré que les meilleures performances ont été obtenues en présence d'acides gras contenant entre 10 et 14 carbones avec une préférence pour l'acide laurique avec un taux de conversion de 100% après 4 h en utilisant 10 mM d'acide gras (Koreishi et al., 2005b). Il a aussi été démontré que l'augmentation de la concentration de l'acide gras influençait négativement l'activité de cette enzyme (Koreishi et al., 2009a). Les propriétés particulières de cette enzyme permettant d'envisager une utilisation industrielle pour l'acylation sélective en milieu aqueux de la lysine en position  $\epsilon$ , plusieurs brevets ont été déposés par Ajinomoto afin de protéger cette enzyme (Nakanishi et al., 2011 ; Takakura, Nozaki, 2018).

### 1.3.3.3 Les aminoacylases I (EC 3.5.1.14)

Toutes les enzymes faisant partie de cette classe, décrites pour leur activité d'acylation d'acides aminés, appartiennent aux zincs métalloenzymes. Ces dernières ont une régiosélectivité et une chimio-spécificité orientées vers l'amine en position  $\alpha$  des acides aminés avec des performances différentes.

L'acetylase I de rein porcin a été décrite par plusieurs auteurs pour l'acylation d'acides aminés. C'est une enzyme homo-dimérique de 45 kDa capable, en présence de glycérol, de réaliser l'acylation de plusieurs acides aminés protéinogènes avec l'acide laurique à l'exception de l'acide aspartique, l'isoleucine et la phénylalanine où une très faible conversion a été mise en évidence (Wada et al., 2002). Elle a aussi été capable de catalyser l'acylation de la méthionine avec différents acides gras à courtes chaînes (inférieures à 8 carbones) en l'absence de glycérol avec des taux de conversion supérieurs à 30 % avec l'acide butyrique (Ferjancic-Biagini et al., 1997).

Koreishi et al., 2005a, 2009b ont décrit deux aminoacylases provenant de *Streptomyces mobaraensis*. La première est une enzyme monomérique de 100 kDa présentant un pH optimal entre 5,5 et 7,5 et une température optimale de 60°C mais une stabilité moins importante au-delà de cette température. Elle a pu catalyser l'acylation d'acides aminés protéinogènes (0.5 M) avec l'acide férulique (0.01 M) en présence de glycérol à 37°C et à pH 7,2 à l'exception de la proline et de la tyrosine et avec de très faibles taux de conversion pour l'acide aspartique, la cystéine, l'histidine et la glycine. Les mêmes auteurs ont démontré que l'activité enzymatique était beaucoup plus importante en absence qu'en présence de glycérol. Ceci a été relié à l'amélioration de la flexibilité interne de l'enzyme en présence d'une quantité plus importante d'eau. L'acylation de la lysine avec des dérivés d'acide férulique a aussi été réalisée montrant une meilleure conversion avec l'acide hydro-cinnamique avec 43,2% de conversion (Koreishi et al., 2005a). La deuxième aminoacylase (Sm-AA) est une métalloenzyme monomérique de 55 kDa. Elle a un pH optimal à 7,5 et une température optimale de 50°C. Elle permet l'hydrolyse des acides aminés acylés avec des acides gras de courtes et longues chaînes avec de meilleurs taux de conversion avec l'acide laurique (C12). L'activité hydrolytique peut être améliorée en présence du chlorure de zinc à faible concentration (0.5 mM) (Koreishi et al., 2009b).

Récemment, une autre aminoacylase provenant de *Burkholderia sp.* isolée à partir d'échantillons de sols a été identifiée (Takakura, Asano, 2019). L'originalité de cette enzyme



## Chapitre I : Étude bibliographique

est sa température optimale de 70°C et son pH optimal de 12 pour l'hydrolyse et de 9 pour la synthèse ainsi que son importante stabilité au pH (entre 5 et 12) et à la température (jusqu'à 1h à 70°C). Ses caractéristiques se rapprochent de celles des enzymes issues des bactéries extrémophiles probablement grâce à leur structure homo-octamérique (42 kDa l'unité) qui leur confère une meilleure résistance aux conditions extrêmes. La production hétérologue de cette enzyme chez *E. coli* BL21 (DE3) a démontré sa dépendance vis-à-vis des ions métalliques divalents ( $Zn^{2+}$  et  $Co^{2+}$ ) qui améliorent l'activité enzymatique ; ce qui n'était pas le cas de l'enzyme issue de la souche sauvage de *Burkholderia sp.* pour laquelle aucun effet n'a été observé. Ces résultats mettent en évidence une différence de structure entre l'enzyme recombinante et l'enzyme native où le zinc est bien intégré dans la structure alors qu'*E. coli* a déjà été décrite comme incapable de bien intégrer le bon ion dans le cas des métalloenzymes (Story et al., 2001). L'évaluation de l'activité synthétique des acides aminés lauroylés a montré que cette enzyme est limitée à l'acylation de quelques acides aminés naturels avec de très bons taux de conversion en présence d'arginine (89%) et de phénylalanine (51%) (tableau 1.5). Le résultat avec l'arginine a été attribué au fait que le produit précipite au cours de la réaction déplaçant ainsi l'équilibre thermodynamique vers la réaction de synthèse (Takakura, Asano, 2019).

Tableau 1-5 : activité de synthèse de différents lauroyl-acides aminés par les aminoacylases de *Burkholderia sp.* (Takakura, Asano, 2019)

Product	Yield (%)	LC-MS
<i>N</i> -lauroyl-L-phenylalanine (Lau-Phe)	51	+
<i>N</i> -lauroyl-L-alanine	4.7	+
<i>N</i> -lauroyl-DL-aspartic acid	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-L-glutamic acid	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-glycine	5.5	+
<i>N</i> -lauroyl-L-asparagine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-glutamine	8.2	+
<i>N</i> -lauroyl-L-arginine (Lau-Arg)	89	+
<i>N</i> -lauroyl-L-lysine	28	+
<i>N</i> -lauroyl-L-histidine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-serine	13	+
<i>N</i> -lauroyl-L-threonine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-valine	23	+
<i>N</i> -lauroyl-L-leucine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-isoleucine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-methionine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-tryptophan	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-tyrosine	Unk	+
<i>N</i> -lauroyl-L-proline	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-L-pyrrolidone carboxylic acid	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-L-theanine	2.6	+
<i>N</i> -lauroyl-D-phenylalanine (Lau-D-Phe)	0	N.D.
<i>N</i> -lauroyl-D-arginine (Lau-D-Arg)	0	N.D.

The condensation reaction was performed in 100 mM sodium borate buffer, pH 9.0, containing 2 µg/mL purified enzyme, 100 mM sodium laurate, and 200 mM amino acid. The reaction was carried out for 60 h at 25°C in a solution volume of 200 µL.

Unk (unknown); + (detected); N.D. (not detected)

❖ **Les acylases de *Streptomyces ambofaciens***

Ferrari (2014) a mis en évidence la présence d'acylases au niveau de l'extrait protéique d'une culture de *S. ambofaciens* ATCC23877. Ces dernières étaient capables de réaliser la réaction d'hydrolyse de l' $\alpha$ - et de l' $\epsilon$ -acétyl-lysine ainsi que la réaction d'acylation de la lysine et de plusieurs peptides contenant de la lysine avec l'acide oléique sur leur fonction amine en position  $\alpha$ . L'étude des conditions d'hydrolyse a permis d'identifier une température optimale entre 40 et 45°C et un pH optimum entre 8 et 9 (figure 1.15). Les réactions d'acylation ont été réalisées dans du tampon Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM pH 8, T = 45°C. L'analyse du produit de la réaction par LC-MS-MS a permis de confirmer l'acylation en position  $\alpha$  de la lysine ainsi que la O-acylation de la sérine à très faible niveau dans le cas de di- et tripeptide. Ces performances ont été comparées à celles de la lipase CALB qui s'est révélée capable de catalyser la réaction d'acylation uniquement de la lysine sur l'amine en position  $\epsilon$  (Ferrari, 2014a).

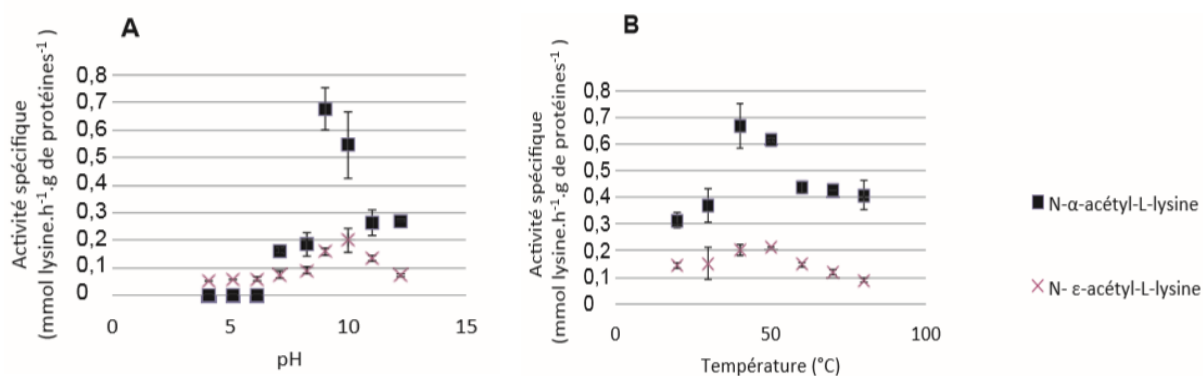


Figure 1.15 : couple pH/température d'hydrolyse optimale des N- $\alpha$  et  $\epsilon$ -acétyl-L-lysine de l'extrait brut de *S. ambofaciens*. A : effet du pH à T = 37°C ; B : effet de la température à pH 8. Conditions expérimentales : tampon tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, 2 g/L d'extrait enzymatique et 4 mM du substrat pendant 24h (Ferrari, 2014a).

Une étude comparative du génome de cette souche et des gènes codant pour les différentes acylases identifiées chez *S. mobaraensis* (Sm-AA, Sm-ELA et Sm-PVA) a été réalisée. Cela a permis de mettre en évidence la présence de trois gènes similaires avec 86, 80 et 69 % d'identité de séquences, nommés Sam-AA, Sam-ELA et Sam-PVA, respectivement, en plus d'un quatrième gène présentant 55% d'identité avec Sm-AA nommé Sam-AA like. Ces gènes étaient répartis sur deux différentes portions du génome bactérien séparant Sam-AA et Sam-AA like d'une part et Sam-ELA et Sam-PVA d'autre part (Ferrari, 2014a ; Dettori et al., 2017). Par ailleurs, aucune caractérisation approfondie des performances catalytiques de cette enzyme n'a été réalisée.

Ainsi, l'utilisation d'enzymes pour catalyser des réactions d'acylation d'acides aminés est très attractive d'un point de vue environnemental mais cela n'est pas le cas vis-à-vis du coût du

procédé. Les enzymes utilisées en catalyse homogène présentent plusieurs inconvénients dont la non-réutilisation possible du catalyseur et parfois sa faible stabilité. Afin de remédier à cela l'utilisation de l'enzyme en système hétérogène (enzyme immobilisée sur un support) peut s'avérer très utile.

### 1.4 Immobilisation d'enzymes

Afin de rendre un procédé enzymatique viable économiquement, la récupération et la réutilisation ainsi que le maintien de la stabilité du biocatalyseur aux conditions de mise en œuvre (température, pH, solvants, ...) sont des paramètres très importants pour envisager un développement à l'échelle industrielle (Zhao, 2010). L'immobilisation des enzymes est l'un des moyens les plus appropriés permettant une stabilisation de la structure de l'enzyme (rigidification) à la surface du support augmentant sa résistance aux conditions réactionnelles et facilitant sa récupération ou son utilisation en continu, réduisant ainsi le coût du procédé associé à la production préalable du biocatalyseur. L'usage d'enzymes immobilisées a permis leurs utilisation à plus large échelle pour la production de nombreuses molécules d'intérêt : acide aminé, de sucres, précurseurs d'antibiotiques... (Zhou, Hartmann, 2013). Par exemple, la glucose isomérase immobilisée est actuellement et depuis longtemps utilisée pour la production du D-fructose à partir du D-glucose à l'échelle industrielle avec une productivité supérieure à 10 tonnes par kg de catalyseur. De même, l'utilisation de la pénicilline G amidase immobilisée pour la production industrielle de l'acide 6-amino-penicillanique, précurseur de plusieurs antibiotiques, a été développée et brevetée par plusieurs entreprises pharmaceutiques telles que Bayer et Beecham (Buchholz, 2016 ; Sheldon, Pereira, 2017). La production d'esters et d'autres molécules pour l'industrie cosmétique, alimentaire et de l'énergie par les lipases immobilisées a aussi été largement décrite (Ansorge-Schumacher, Thum, 2013 ; Sá et al., 2017 ; Basso, Serban, 2019 ; Filho et al., 2019). Par ailleurs, l'immobilisation est souvent accompagnée d'une perte d'activité enzymatique causée par différents phénomènes tels que des limitations de transfert du substrat vers le site actif, une inactivation de l'enzyme suite à l'interaction de résidus importants pour la catalyse avec le support ou bien un changement de la conformation 3D de l'enzyme après fixation. Les conditions pour qu'un procédé utilisant des enzymes immobilisées soit économiquement viable pour une utilisation industrielle sont : un maintien maximum de l'activité au cours du temps, une bonne résistance mécanique, thermique et aux solvants utilisés ainsi qu'une bonne recyclabilité avec une désorption minimale de l'enzyme (Sheldon, Brady, 2019). A cet effet, le choix du matériau, de la technique et des conditions

d'immobilisation sont très importants et très variables pour chaque enzyme dans un environnement spécifique (End, Schöning, 2004).

### 1.4.1 Matériaux utilisés pour l'immobilisation d'enzymes

Afin de mettre en place un procédé d'immobilisation le choix du matériau et de la méthode d'immobilisation doit être adapté à chaque enzyme. Cela a favorisé le développement d'un nombre très important de supports d'immobilisation de différentes natures présentant ainsi des propriétés physicochimiques et mécaniques très variées (figure 1.16).

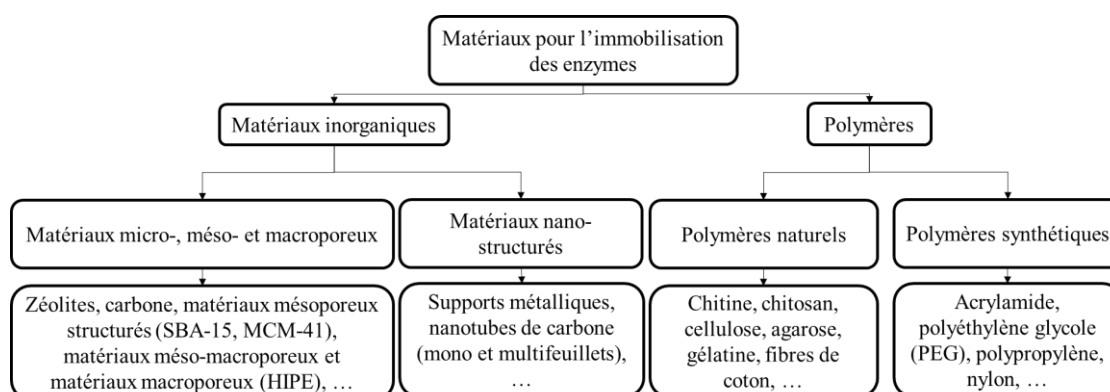


Figure 1.16 : représentation schématisée des principaux supports d'immobilisation

#### 1.4.1.1 Matériaux à base de polymères naturels

Les biopolymères sont des molécules biocompatibles, biodégradables et peu toxiques. Des molécules tels que la cellulose, l'amidon, l'agarose, la gélatine, la chitine et le chitosane, largement présentes dans l'environnement, ont été utilisées pour l'immobilisation d'enzymes (de Albuquerque et al., 2018). Ces polymères sont soit extraits directement de ressources naturelles ou obtenus par polymérisation, ce qui facilite le contrôle de la taille du matériau en contrôlant les conditions de synthèse de ce dernier (température, pH, pression, agitation, temps ...) (Thangaraj, Solomon, 2019). En plus de leurs propriétés physicochimiques variées, la présence de groupements organiques en surface facilite leur fonctionnalisation afin de moduler par exemple leur hydrophobie (Estruch et al., 2008). Par exemple, l'utilisation du biochar provenant de la pyrolyse de la biomasse comme support d'immobilisation est de plus en plus attractive. Les propriétés physicochimiques de ce dernier permettant l'immobilisation sont sa porosité, sa surface spécifique intéressante et ses propriétés de la surface qui sont facilement ajustables selon les conditions de leurs production, en particulier par le contrôle de la température de pyrolyse (figure 1.17) (Pandey et al., 2020). Cea et al. (2019) ont utilisé ce support pour l'immobilisation par adsorption de la lipase de *Candida rugosa* et évalué son activité d'estérification de l'acide oléique avec de l'éthanol. L'évaluation des paramètres

influençant l'immobilisation a montré une augmentation du taux d'immobilisation avec l'augmentation de la température permettant une activité et une stabilité thermique meilleure que celle de l'enzyme libre (Cea et al., 2019).

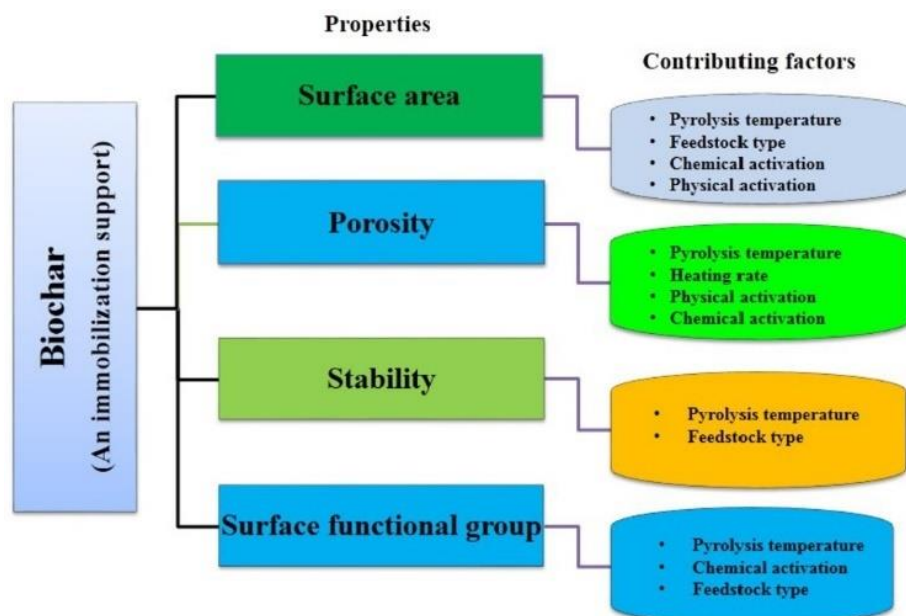


Figure 1.17 : facteurs influençant les propriétés physicochimiques lors de l'immobilisation des enzymes sur du biochar (Pandey et al., 2020)

#### 1.4.1.2 Matériaux à base de polymères synthétiques

Ce sont des supports synthétisés par polymérisation de molécules d'origine pétrochimique présentant une grande diversité de propriétés physicochimiques avec une résistance mécanique et thermique importante et variable selon leurs compositions. De très nombreux supports polymériques synthétiques ont été décrits dans la littérature. Parmi ces derniers, les billes en acrylique (méthacrylate), propylène et styrène sont très utilisées pour l'immobilisation d'enzymes (Graebin et al., 2012 ; De Lima et al., 2018). L'un des matériaux les plus utilisés et décrits dans la littérature pour l'immobilisation des lipases est le polyméthacrylate divinyle-benzène poreux (Dos Santos, Zabet, et al., 2016 ; Dias et al., 2018a). Séverac et al. (2011) ont comparé l'utilisation de CALB immobilisée sur un matériau à base de polypropylène (Accurel MP1001) qui est un polymère très hydrophobe à CALB immobilisée sur un support formé d'une résine polyacrylique qui est un matériau très hydrophile (Lewatit VPOC 1600) pour la réaction de transestérification du butanol avec de l'acide oléique dans du n-décane. Les résultats ont montré l'importance du choix de la nature du matériau. Une accumulation du glycérol produit lors de la réaction par affinité sur le support très hydrophile a en effet généré des limitations diffusionnelles de l'acide oléique vers le site actif de l'enzyme, conduisant à une perte

importante d'activité. Par contre, l'utilisation d'un support très hydrophobe a permis une amélioration de l'activité et de la stabilité de CALB immobilisée permettant d'envisager une utilisation industrielle dans des réacteurs à lit fixe (Séverac et al., 2011).

### *1.4.1.3 Matériaux à base de silice*

Les matériaux silicatés sont les matériaux très utilisés dans plusieurs domaines dont l'immobilisation d'enzyme grâce au faible coût du précurseur et à la flexibilité d'usage des groupements Si-O-Si facilitant leur synthèse. De très nombreux supports de cette nature aux caractéristiques variées ont été synthétisés et utilisés pour l'immobilisation de plusieurs enzymes permettant leur utilisation en batch ou en continu pour les réactions enzymatiques, dont les réactions d'estérification et d'amidation (Dettori et al., 2018 ; Bernal et al., 2018a ; Tufiño et al., 2019). Parmi ces supports, les matériaux silicatés ordonnés tels que les SBA-15 (Santa Barbara Amorphous-15), FSM-16 (Folded Sheet Materials-16), MCF (mesostructured cellular foams) sont largement représentés en raison de la facilité et de la reproductibilité de leur fabrication à petite échelle et du contrôle de l'uniformité de taille des pores en modifiant la quantité et la nature du tensioactif qui rentre dans leur formulation (Zhou, Hartmann, 2013). Les supports à base de silice seront décrits plus précisément ultérieurement.

### *1.4.1.4 Matériaux à base de carbone*

De très nombreux matériaux non poreux (nanotubes de carbone et graphènes) et poreux à base de carbone ont été développés et décrits pour leur efficacité lors de l'immobilisation d'enzymes (John Kennedy et al., 2007 ; Reichardt et al., 2018 ; Liu, Dong, 2020). Parmi ces derniers, les nanotubes de carbone sont très utilisés. Ce sont des matériaux biocompatibles présentant une très bonne résistance mécanique, thermique et chimique avec une très importante surface spécifique due à leur structure nanométrique ordonnée (20 à 40 nm) et leur surface hydrophobe mais fonctionnalisable, permettant l'immobilisation d'enzymes par adsorption ou par liaison covalente (Feng, Ji, 2011 ; Prlainović et al., 2011). Plusieurs catégories de nanotubes de carbone ont été décrites selon leur configuration, en particulier l'agencement des feuillets et le traitement chimique exercé sur eux (mono- ou multi-feuillet) (Lee et al., 2010 ; Singh et al., 2014 ; Raghavendra et al., 2013 ; Ferreira et al., 2019). Parmi ces derniers, les nanotubes de carbone en multifeuillets (MWCN) sont les plus utilisés. Plusieurs auteurs ont réalisé l'immobilisation de lipases sur ces supports et ont observé de très bonnes performances parfois supérieures à celles observées avec des enzymes commerciales pour les réactions de transestérification et d'estérification (Shah et al., 2007 ; Szelwicka et al., 2019). Papadopoulou et al. (2013) ont

réalisé la réaction d'acylation de la pyridoxine, du tyrosol et de la tyramine avec l'acide  $\alpha$ -lipoïque en présence de CALB immobilisée sur des nanotubes de carbone dans des liquides ioniques et des solvants eutectiques. Ils ont montré de meilleures activités d'acylation enzymatique par rapport à CALB immobilisée commerciale (Novozyme 435) (Papadopoulou et al., 2013). Shah et al. ont aussi observé une meilleure activité et stabilité dans l'hexane et les liquides ioniques de la lipase de *Candida rugosa* par rapport à l'enzyme lyophilisée. Cette importante augmentation de l'activité était liée à un changement conformationnel de l'enzyme suite à l'interaction avec la surface hydrophobe du support qui s'est traduite par l'ouverture du volet moléculaire (lid), permettant une amélioration du transfert du substrat vers les résidus catalytiques (Shah et al., 2007). Ce phénomène d'activation interfaciale est très souvent observé lors de l'immobilisation des lipases sur des supports hydrophobes et engendre une augmentation de l'activité et de la stabilité enzymatique et, dans certains cas, un changement de la régiosélectivité des lipases (Fernandez-Lorente et al., 2008 ; Abreu Silveira et al., 2017 ; 2019). Pavlidis et al. (2010) ont immobilisé par adsorption CALB sur des nanotubes de carbone multifeuillets fonctionnalisés avec des groupements carboxylique, amine et aliphatique. Le taux d'immobilisation le plus important a été obtenu en présence du groupement carboxylique avec environ 50 % d'immobilisation alors que la meilleure activité d'estérification a été obtenue en présence du groupement aliphatique due à une probable mauvaise orientation (Pavlidis et al., 2010a).

Les oxydes de graphène sont d'autres types de supports carbonés similaires aux nanotubes de carbone (surface spécifique, résistance mécanique et thermique) largement utilisés dans différents domaines dont l'immobilisation d'enzymes (Shan et al., 2009). La présence de groupements carboxyle, hydroxyle et époxy à la surface de ces supports facilite l'immobilisation des enzymes par interactions électrostatiques ou par des liaisons covalentes, ce qui peut améliorer l'activité enzymatique et la stabilité lorsque les enzymes ont une bonne orientation (Jiali Zhang et al., 2010 ; Qingzhong Li et al., 2013). Dans certains cas, la formation de ces interactions électrostatiques n'est pas favorable à l'activité enzymatique (Yan Zhang et al., 2012). Certains auteurs ont décrits la possibilité de moduler le caractère hydrophobe de la surface du support par réduction des groupements fonctionnels, permettant ainsi une amélioration de l'adsorption et de l'activité enzymatique (figure 1.18) (Compton, Nguyen, 2010 ; Duan et al., 2015). Cela permet la synthèse de graphènes réduits qui sont des supports également très utilisés pour l'immobilisation d'enzymes. Hermonanová et al. (2015) ont évalué la stabilité thermique et au solvant de la lipase de *Rhizopus oryzae* immobilisée par adsorption,

liaison covalente sur des oxydes de graphène ainsi que par réticulation en surface de ces supports. Les enzymes présentaient une très bonne stabilité thermique en particulier lorsqu'elles étaient immobilisées par liaison covalente en comparaison avec l'enzyme libre avec 65% d'activité résiduelle après incubation de l'enzyme immobilisée à 70°C contre le même taux après incubation de l'enzyme libre à 40°C (Hermanová et al., 2015). Les mêmes observations ont été décrites par Tan et al. (2019) lors de l'immobilisation de la glutaryl-7-aminocephalosporanique acide acylase sur des oxydes de graphène (Tan et al., 2019c).

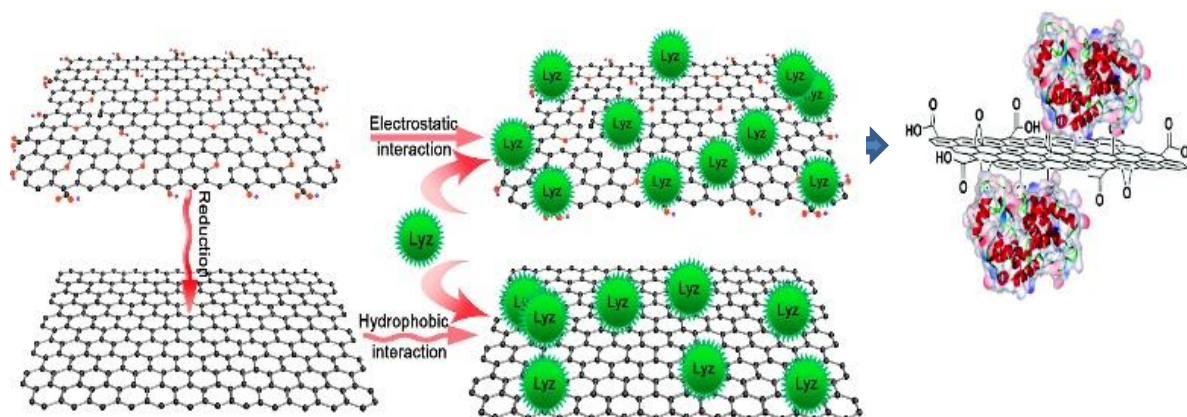


Figure 1.18 : représentation de l'organisation moléculaire des oxydes de graphène et des oxydes de graphène réduits (Jiali Zhang et al., 2010 ; Duan et al., 2015)

#### 1.4.1.5 Les supports magnétiques

Afin de faciliter la séparation et d'augmenter la résistance mécanique des matériaux, des supports magnétiques peuvent être utilisés pour l'immobilisation d'enzyme. Ces derniers sont obtenus par mélange d'une solution contenant du fer (chlorure de fer, ...) avec un polymère afin de former des nanoparticules poreuses ou en recouvrant des particules de fer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) d'un polymère obtenant ainsi un cœur magnétique. De très nombreux supports magnétique poreux et non-poreux ont été développés ces dernières années à base de polymères de nature très variée, permettant de moduler les caractéristiques de la surface des supports tout en facilitant leur récupération. Les enzymes immobilisées par adsorption ou par liaison covalente sur ces supports ont présenté des activités et stabilités aux conditions réactionnelles (température, pH, ...) très attractives, permettant d'envisager une adaptation à la production industrielle par le biais de ces enzymes (Sheng et al., 2018 ; Lin et al., 2019 ; Bezerra et al., 2020 ; Sahin, Ozmen, 2020 ; Zhong et al., 2020).

#### 1.4.2 Caractéristiques du support

Le choix du diamètre des pores le plus adapté à l'immobilisation est crucial afin de minimiser les limitations de transfert de matière vers l'enzyme et de stabiliser cette dernière au niveau des



pores (Estruch et al., 2008). Les supports utilisés pour l'immobilisation peuvent être classés selon la présence ou l'absence de pores, selon la taille des pores et selon l'organisation de ces derniers. La taille des pores peut varier de 1 nm à plusieurs dizaines de micromètres (Figure 1.19.A). On retrouve ainsi les matériaux microporeux de taille de pores inférieure à 2 nm tels que les supports siliceux microporeux (zéolites) et les supports carbonés (nanotubes de carbone et les graphènes). L'immobilisation sur ces matériaux se fait en surface externe qui est très importante en raison de leur taille et structure nanométrique, mais avec une importante exposition aux conditions extérieures. Les matériaux macroporeux présentent des diamètres de pores supérieurs à 50 nm avec une surface spécifique plus faible (environ 100 m<sup>2</sup>/g, parfois significativement plus). La macroporosité permet par ailleurs de meilleurs transferts des substrats et produits et de leur solvant dans la porosité du matériau. Cao (2005) a recommandé l'usage de pores ayant environ 10 fois le diamètre de la protéine immobilisée afin de faciliter l'immobilisation et les transferts de matière (Cao, 2005b). Le cas le plus connu et le plus utilisé dans la littérature est la CALB immobilisée sur des billes macroporeuses de poly-méthacrylate divinylebenzène (Lewatit VP OC 1600) appelé « Novozyme 435 ». Ces billes ont été analysées par Mei et al. (2002) en utilisant de la micro-spectroscopie infrarouge synchrotron et de la microscopie électronique à transmission. Les résultats ont montré une conservation de la structure 3D de l'enzyme immobilisée. Les auteurs ont démontré que la lipase était répartie au niveau des 90 premiers µm sous la surface externe des billes et la taille des pores (100 nm) était environ 10 fois plus importante que celle de l'enzyme permettant un bon échange de matière avec le milieu externe (Mei et al., 2003). Un autre exemple est l'utilisation des supports siliceux monolithiques macro-mésocellulaires appelé HIPE (High Internal Phase Emulsion) pour l'immobilisation de *Thermomyces lanuginosus* pour la réaction de transestérification (Backov, 2012b). L'enzyme immobilisée a présenté une bonne activité et une excellente stabilité au cours du temps avec une bonne rétention d'activité même après 60 jours d'utilisation.

Les supports mésoporeux présentent une taille de pores intermédiaire entre 2 et 50 nm avec une surface spécifique également souvent intermédiaire par rapport aux supports microporeux et aux supports macroporeux. Parmi ces matériaux, les supports mésoporeux ordonnés présentant un diamètre et une forme de pores homogène sont les plus utilisés pour l'immobilisation des enzymes (Zucca, Sanjust, 2014). En effet, étant donné que le diamètre des enzymes est généralement proche de la taille des pores du support, cela permet une meilleure stabilisation (rigidification) de la conformation 3D de l'enzyme (figure 1.19.B) (Takahashi et al., 2000 ; Lu et al., 2011). Certains auteurs ont noté une plus faible stabilité structurale en augmentant la taille des pores du supports liée à une flexibilité plus importante de la conformation 3D de

l'enzyme ainsi qu'une désorption facile de l'enzyme immobilisée (Yiu et al., 2001 ; Sang, Coppens, 2011). En revanche, l'utilisation de mésopores pour l'immobilisation peut engendrer des limitations diffusionnelles du substrat vers l'enzyme (Kang et al., 2007). L'utilisation de matériaux présentant une structure tridimensionnelle interconnectée de pores tels que les MCFs (Mesocellular foams) et les SBA16 pourrait présenter un intérêt en réduisant les problèmes d'accessibilité des enzymes et des substrats à l'intérieur de la structure (Washmon-Kriel et al., 2000).

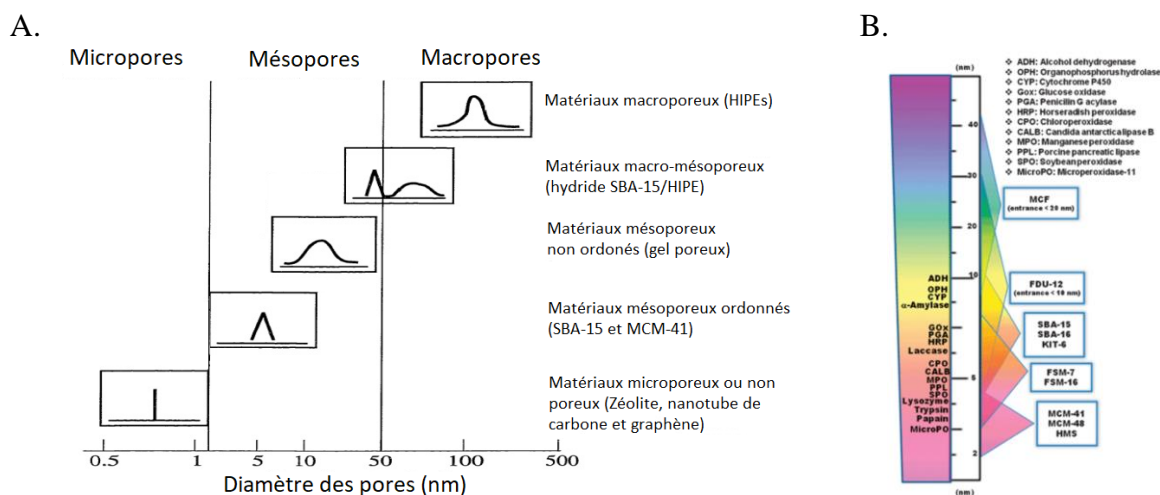


Figure 1.19 : classification des matériaux selon le diamètre des pores (A) et comparaison du diamètre des pores des supports mésoporeux ordonnés et du diamètre des enzymes (B ; (Zhou, Hartmann, 2013)).

L'utilisation de supports avec une structure contenant à la fois une mésoporosité et une macroporosité (on parle alors de porosité hiérarchisée) pourrait s'avérer aussi très utile afin d'exploiter les avantages de la présence de mésopores (stabilisation de la structure de l'enzyme et assez grande surface spécifique) et des macropores (meilleur transfert de matière) (Roucher et al., 2018a ; Zhou et al., 2019) (figure 1.20). Cela a permis à certains auteurs de réaliser des réactions de transestérification en continu suite à l'immobilisation de leur enzyme sur des supports silicatés présentant des mésopores d'environ 20 nm et des macropores d'entre 30 et 50 µm de diamètre (Szymańska et al., 2016).

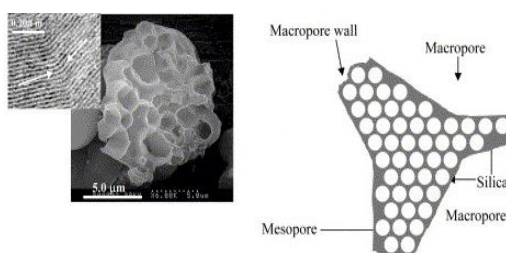


Figure 1.20 : organisation d'un support avec une structure de pores hiérarchiquement ordonnés (Blin et al., 2006)

### 1.4.3 Techniques d'immobilisation

L'immobilisation des enzymes sur ces supports peut se faire soit par adsorption physique (physisorption) en faisant appel à des liaisons faibles (Van der Waals, ionique, hydrophobe/hydrophile, ...) soit par des liaisons covalentes (chimisorption) (figure 1.21). D'autres méthodes d'immobilisation telles que l'encapsulation et l'agrégation des protéines ont aussi été décrites. Les différentes techniques les plus utilisées pour l'immobilisation des enzymes seront décrites ci-dessous (figure 1.21).

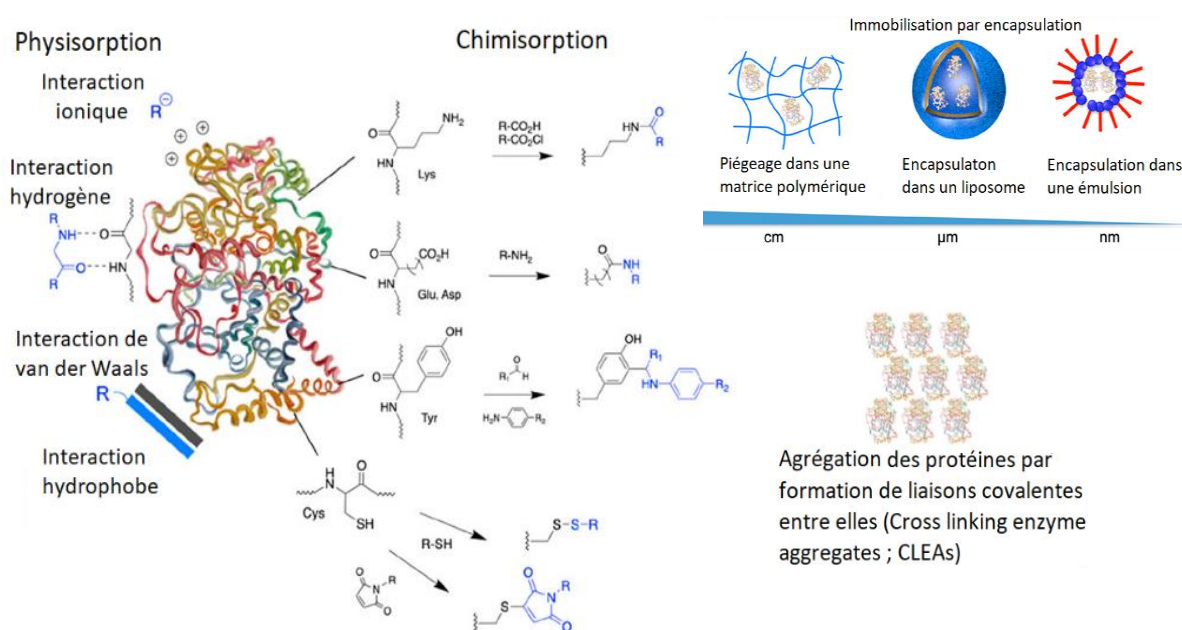


Figure 1.21 : les principales techniques d'immobilisation d'enzymes (à partir de Chapman, Stenzel, 2019)

#### 1.4.3.1 Immobilisation par adsorption

L'immobilisation par adsorption sur un support est la méthode d'immobilisation la moins coûteuse et la plus simple à réaliser. Elle consiste à mettre en contact une suspension d'enzymes avec un support. L'adhésion du catalyseur soluble sur le support se fait par affinité par l'implication de liaisons faibles telles que les interactions de Van der Waals, hydrogène, hydrophobes et électrostatiques. L'immobilisation dépend de la nature chimique du matériau et surtout de ces propriétés physicochimiques en surface (polarité, charge et présence de groupements spécifiques) qu'il faut adapter aux propriétés de la surface des enzymes (caractéristiques physicochimiques des résidus d'acides aminés présents à la surface de l'enzyme, i.e. résidus hydrophobes ou hydrophiles, présentant des groupements amines ou carboxyliques) lors de leur immobilisation. Le pH lors de l'immobilisation influence l'état d'ionisation de l'enzyme et du support en intervenant sur la charge en surface de ces derniers

favorisant ou pas les interactions électrostatiques. Wang et al. (2005) ont réalisé l'immobilisation de plusieurs enzymes sur un support siliceux présentant un pI de 3. Ils ont observé une immobilisation plus importante des enzymes ayant un pI supérieur à 7 (pH utilisé lors de l'immobilisation) par implication d'interaction électrostatique (Wang, Caruso, 2005). La présence d'un grand nombre de groupements silanes (-Si-OH) à la surface des matériaux poreux siliceux confère un caractère très hydrophile au support ce qui peut être limitant lors de l'immobilisation des enzymes lié aux faibles interactions (hydrogène et Van der Waals) qui peuvent être à l'origine d'une désorption importante de l'enzyme suite au recyclage (Jacoby et al., 2013 ; Carteret et al., 2018). De plus, ces derniers présentent un point isoélectrique très bas (pI d'environ 3) ce qui peut engendrer des effets de répulsion électrostatique avec l'enzyme lorsque l'immobilisation est réalisé à des pH basiques (Maria Chong, Zhao, 2004 ; Grimaldi et al., 2015). Par ailleurs, ces groupements silanes représentent un point d'ancrage important des groupements organiques fonctionnels ou organosilanes (Gooding, Ciampi, 2011). Afin d'améliorer l'affinité des enzymes pour le support, les matériaux en particulier les matériaux poreux siliceux peuvent être fonctionnalisés soit par co-condensation en ajoutant un modificateur organique ou un métal lors de la préparation du matériau ou par greffage d'un groupement organique après synthèse du matériau (figure 1.22.A et B). Cela permet la modification des propriétés du matériau adaptant ainsi, par exemple, le caractère hydrophobe ou la charge en surface. Par ailleurs, il est important de prendre en considération le fait que l'introduction de groupements fonctionnels dans la structure du support peut conduire à une réduction de la taille des pores et du volume poreux (Brühwiler, 2010 ; Kang et al., 2007). Différents types de groupements peuvent être greffés sur les supports siliceux permettant de cibler des résidus spécifiques tels que la lysine et la cystéine ou des groupements spécifiques tels que les groupements carboxyle, hydroxyle ou amines présents à la surface de l'enzyme (figure 1.22.C) (Hoarau et al., 2017). Le choix du groupement fonctionnel dépend de la structure de l'enzyme et des groupements exposés en surface. Afin de maintenir ou améliorer l'activité et la spécificité de l'enzyme, la bonne orientation du site actif de l'enzyme est très importante. Maria Chong et Zhao (2004) ont comparé les performances de la pénicilline G acylase (PGA) immobilisée sur des SBA-15 modifiées par co-condensation avec des organosilanes de différentes natures chimiques. La fonctionnalisation du support avec le (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) et le vinyltriéthoxysilane (VTES) a permis une augmentation de la quantité d'enzyme adsorbée et un quasi-doublement de l'activité enzymatique par rapport aux enzymes immobilisées sur les SBA-15 non-fonctionnalisés. Ce résultat semble lié à l'augmentation de l'hydrophobie de la surface du support en plus de

## Chapitre I : Étude bibliographique

l'implication de liaisons électrostatiques et hydrogène (figure 1.23) (Maria Chong, Zhao, 2004). L'acylase I d'*Aspergillus melleus* a été immobilisée sur des supports silicatés (Stöber silica) fonctionnalisés avec de l'APTES et du glutaraldéhyde à pH 7. L'activité et la stabilité les plus importantes de l'enzyme ont été observées après immobilisation sur les supports fonctionnalisés avec de l'APTES due à une bonne rigidification et orientation de l'enzyme sans altération de sa conformation. La réactivité du glutaraldéhyde utilisé a été mise en cause dans la perte d'activité en dénaturant l'enzyme après immobilisation (Kołodziejczak-Radzimska et al., 2018). Plusieurs autres auteurs ont réalisé l'immobilisation d'enzymes (lipases et d'acylases) sur les supports silicatés fonctionnalisés avec de l'APTES observant les mêmes résultats décrits précédemment (Shah et al., 2008 ; Bernal et al., 2018a).

L'hydrophobie du matériau influence considérablement l'adsorption et l'activité des enzymes selon les propriétés de surface de l'enzyme utilisée. Plusieurs auteurs ont décrit une perte d'activité enzymatique après immobilisation sur des supports très hydrophobes et ont tenté de comprendre le mécanisme moléculaire expliquant ces résultats en réalisant des études structurales de différentes enzymes après immobilisation sur des supports de différentes polarités (Raffaini, Ganazzoli, 2010 ; 2012). Les résultats obtenus montrent d'importants changements de la conformation secondaire de l'enzyme suite à l'immobilisation sur les supports hydrophobes causée par l'interaction des résidus d'acides aminés non seulement hydrophobes mais aussi hydrophiles tels que l'arginine avec le matériau. Par ailleurs, une fois que l'enzyme est stabilisée sur le support, très peu de changements sont visibles. Sur les supports hydrophiles, peu de changements de la configuration 3D de l'enzyme ont été enregistrés en raison de la faible force d'interaction avec le support en comparaison avec le support hydrophobe. Plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation de supports avec un équilibre hydrophobe/hydrophile moyen afin de maintenir une conformation active des enzymes immobilisées et ainsi d'obtenir un biocatalyseur avec l'activité et la stabilité recherchées (Radhakrishna et al., 2013 ; Grimaldi et al., 2015).

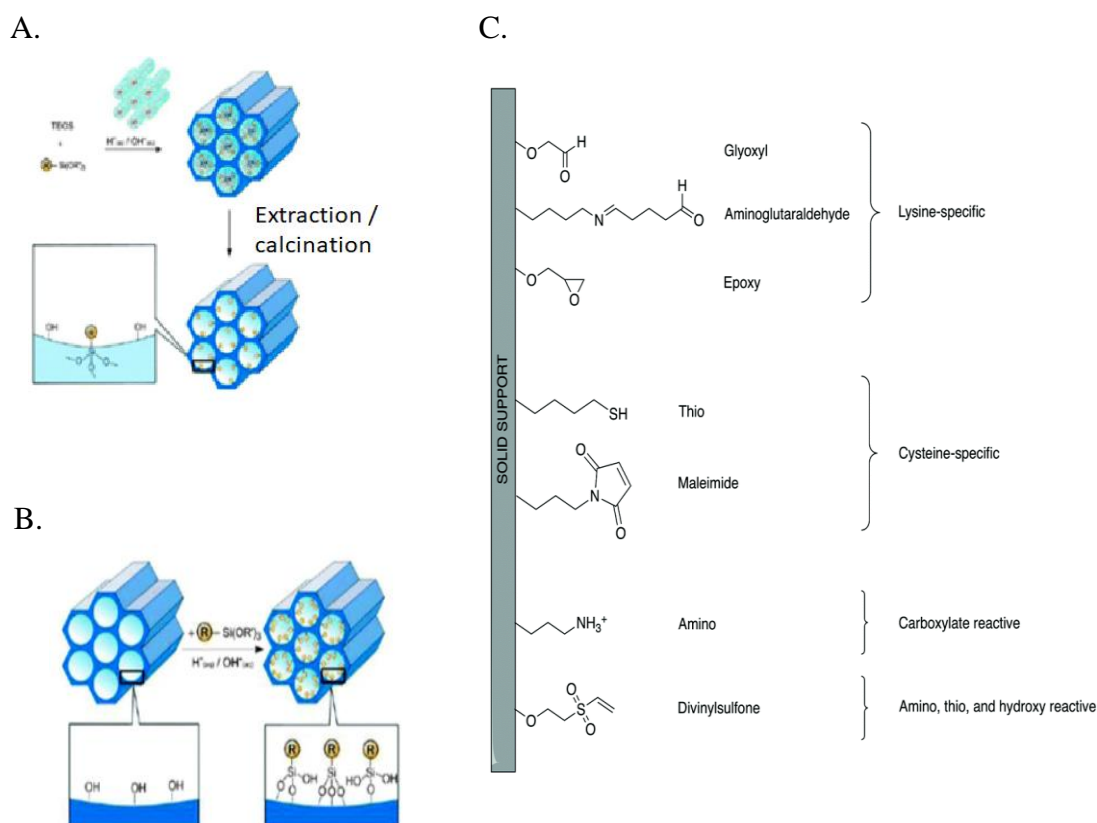


Figure 1.22 : méthode de Co-condensation (A) et de greffage (B) des groupements organiques sur les supports à base de silice (R = groupement organique fonctionnel) et groupement fonctionnels généralement utilisé pour la modification de la surface des supports (C) (Hartmann, Kostrov, 2013a ; Hoarau et al., 2017)

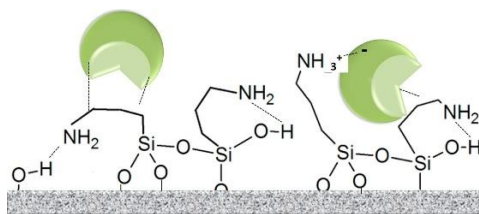


Figure 1.23 : interactions possibles entre l'enzyme et le support fonctionnalisé avec de l'APTES (Bernal, Poveda-Jaramillo, et al., 2018)

#### 1.4.3.2 Immobilisation par chimisorption

L'immobilisation des enzymes par chimisorption consiste en la formation d'une liaison covalente entre l'enzyme par implication des acides aminés à la surface de cette dernière contenant des groupements nucléophiles libres (amine, carboxylique, thiol, ...) et le support (figure 1.21).

Dans ce cas les enzymes sont immobilisées sur des supports préalablement fonctionnalisés soit avec des molécules organiques telles que l'APTES puis l'immobilisation est réalisée en rajoutant une molécule qui formera un pont entre l'enzyme et le support tel que le glutaraldéhyde, soit par le greffage de groupement contenant une fonction epoxy telle que le

(3-Glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (glymo) qui permet sous certaines conditions (molarité, force ionique et pH du tampon) de former des liaisons covalentes entre l'enzyme et les supports après ouverture du cycle epoxy. De nombreux autres agents organiques peuvent servir de point d'ancrage après greffage sur les groupements silanes du support silicaté par exemple (i.e. isocyanate) et plusieurs techniques d'activation de ces groupement sont décrites dans la littérature (Zucca, Sanjust, 2014). La lysine est l'un des acides aminés de la surface de l'enzyme généralement impliqués dans la formation de liaisons covalentes mais d'autres résidus contenant des groupement nucléophiles (l'histidine, la cystéine, la tyrosine, ...) peuvent aussi être impliqués. Dans le cas où l'enzyme contient très peu de lysine en surface, une étape d'amination des résidus d'acides aminés acides par l'utilisation d'une solution d'éthylène-diamine pourra améliorer les interactions (Bernal et al., 2013). Les performances des enzymes immobilisées dépendent de la structure de l'enzyme et de la nature et des propriétés de la molécule utilisée pour son ancrage (spacer). En effet, si l'enzyme contient peu de résidus d'acides aminés permettant l'ancrage ou si la fonctionnalisation a été réalisée avec une trop faible concentration de fonctionnalisant organique, peu de liaisons covalentes seront obtenues. Cela résulte en une meilleure flexibilité de l'enzyme mais avec un risque élevé de dénaturation contrairement au cas où il y a présence de multiples points d'ancrage qui permettent une rigidification plus importante de l'enzyme conduisant à une meilleure stabilité structurale (figure 1.24). Les propriétés du modificateur organique tel que sa longueur peuvent aussi jouer un rôle dans les performances catalytiques. L'utilisation d'un court spacer conduit à une rigidification plus importante de l'enzyme mais cela peut engendrer des limitations de transfert de matière contrairement à l'utilisation d'un long spacer qui permet une bonne flexibilité de l'enzyme et une bonne accessibilité des substrats. Par ailleurs, une dégradation des performances de l'enzyme peut être observée dans tous les cas de figure suite à une dénaturation de l'enzyme par la formation de liaisons covalentes avec les résidus proche du site catalytique de l'enzyme.

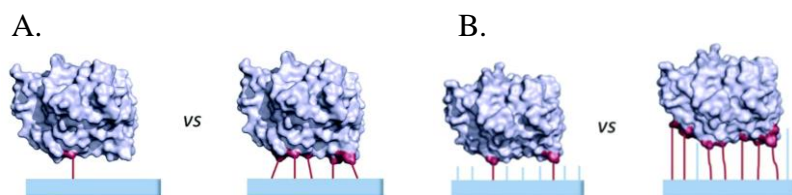


Figure 1.24 : schéma des différents points d'ancrage possibles de l'enzyme sur un support, A : un seul vs plusieurs points d'ancrage, B : ancrage avec des spacers de différentes longueurs (Hoarau et al., 2017)

## Chapitre I : Étude bibliographique

Le choix du groupement fonctionnel lors de l'immobilisation doit être adapté à l'enzyme utilisée et aux conditions de mise en œuvre. Plusieurs auteurs ont observé une meilleure immobilisation covalente des enzymes après greffage sur des supports contenant des cycles époxy en surface (Fei et al., 2016 ; Tong et al., 2019). L'augmentation du pH et de la force ionique du tampon d'immobilisation améliorent la formation de liaisons covalentes entre l'enzyme et le support à multiples points en neutralisant les charges des groupements amine de la chaîne latérale des lysines présentes à la surface de l'enzyme et en favorisant la réactivité et l'ouverture des cycles epoxy permettant un meilleur attachement dans le cas de l'utilisation du glymo (Mateo et al., 2000). Certains auteurs ont aussi décrits l'amélioration de l'activité et de la stabilité thermique et aux solvants organiques des enzymes après modification de leur structure en rajoutant des résidus lysine à la surface ou en réalisant l'amination des acides aminés acides de la surface des enzymes permettant de former un ancrage à multiple points avec le support (Bernal et al., 2013 ; 2014 ; Vikas, Srashti, 2014).

Plusieurs études ont réalisé l'immobilisation des enzymes en utilisant cette méthode observant le maintien d'une bonne activité tout en améliorant la stabilité de l'enzyme (Canilho et al., 2013 ; Xiang et al., 2018). De Lima et al. (2018) ont réalisé la réaction d'estérification de plusieurs molécules avec différents acides carboxyliques en utilisant des lipases de différentes espèces immobilisées sur des billes acryliques par liaison covalente par l'intermédiaire d'un groupement époxy et sur de la silice contenant un groupement octyle pour l'immobilisation de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* par interaction hydrophobe. Toutes les enzymes immobilisées présentaient une très bonne activité enzymatique ainsi qu'une excellente stabilité au recyclage sauf dans le cas de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* où une perte d'activité entre les cycles a été observée lors de l'immobilisation par liaison covalente et une bonne stabilité lors de l'immobilisation par des interactions hydrophobes (De Lima et al., 2018). D'autres auteurs ont décrit une perte très importante des performances des enzymes suite à la formation de liaisons covalentes qui peut engendrer une dénaturation de la structure. C'est le cas de l'étude décrite par Dettori et al. (2018) qui ont réalisé l'immobilisation de l'extrait brut des aminoacylases de *Streptomyces ambofaciens* sur des SBA-15 par physisorption et par chimisorption en utilisant du glutaraldéhyde et du glymo. Une perte quasi-totale de l'activité a été observée suite à la chimisorption contrairement à la physisorption où 30 % d'activité a été retrouvée (Dettori et al., 2018).



### 1.4.3.3 Encapsulation

Il s'agit de piéger l'enzyme à l'intérieur des pores du support. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour y parvenir. En général, l'enzyme est initialement immobilisée sur le support poreux par adsorption physique (physisorption) puis piégée à l'intérieur de la structure par ajout d'un film externe poreux (Ishizuka et al., 2018). Cela permet une augmentation importante du taux d'immobilisation avec de meilleures performances et une meilleure stabilité aux conditions réactionnelles et au recyclage (Wang, Caruso, 2005). Cependant, des limitations de transfert de matière peuvent être observées dans le cas d'une trop faible porosité de la couche externe et la présence d'une quantité importante d'enzyme pouvant obstruer les pores. Blin et al. (2014) ont développé ce genre de méthode d'immobilisation par l'utilisation de double émulsion afin d'encapsuler l'enzyme et de former un matériau final avec une macroporosité contenant l'enzyme et une mésoporosité permettant l'accès du substrat. Les performances de la lipase de *Mucor miehei* immobilisée dans ces derniers ont été comparées à celles de la même lipase immobilisée par adsorption sur les supports mésoporeux SBA-15 présentant un diamètre de pores similaire. Le système à double émulsion présentait une stabilité au cours du recyclage bien meilleure que celle des enzymes immobilisée sur les SBA-15 (Blin et al., 2014a). Han et al. (2006) ont réalisé l'immobilisation de CALB en la piégeant dans un support à base de silice (MCF ; mesocellular foam) sur lequel une chaîne carbonée (C8) a été greffée afin de la rendre plus hydrophobe. Le support était caractérisé par des pores interconnectés d'un diamètre interne d'environ 25 nm et d'un diamètre de la fenêtre d'entrée inter-pores d'environ 14,5 nm ce qui a permis d'améliorer le transfert du substrat vers l'enzyme. Les résultats de l'activité enzymatique ont montré que l'enzyme immobilisée sur ces supports présentait une activité et une stabilité thermique (y compris au cours du recyclage) supérieures à celle de la CALB commerciale (Novozyme 435) (Han et al., 2006a). Afin d'augmenter le taux d'encapsulation des molécules telles que des tensioactifs et du polyamide peuvent être ajoutées lors de l'immobilisation (El-Batal et al., 2005 ; Escobar et al., 2013 ; 2018). Escobar et al. (2018) ont rajouté du polyéthylèneimine lors de l'immobilisation de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* par encapsulation. Cela a conduit, d'une part, à une augmentation du taux d'immobilisation et, d'autre part, à une meilleure activité et stabilité thermique de l'enzyme (Escobar et al., 2018). Afin d'augmenter la stabilité des enzymes encapsulées, certains auteurs ont réalisé une immobilisation par chimisorption sur les supports avant encapsulation permettant de maintenir une bonne activité catalytique après rigidification des enzymes à l'intérieur du support (Xie, Zang, 2017).

#### 1.4.3.4 Immobilisation par réticulation

Le principe de cette méthode est la précipitation des protéines par la formation d'un pontage par liaison covalente entre les enzymes en l'absence de matériau (Cross linking enzyme aggregates ou CLEAs). Le glutaraldéhyde est le plus utilisé pour la formation de ces liaisons covalentes. Certains auteurs ont utilisé cette méthode pour la stabilisation de l'activité des enzymes telles que les acylases (Sheldon, 2007 ; Vaidya et al., 2012). Par ailleurs, afin d'éviter le lessivage d'enzymes immobilisées sur des supports poreux, une agrégation contrôlée de ces dernières par formation de CLEA peut présenter un intérêt. Dans ce cas, les enzymes sont initialement immobilisées sur le support par physisorption ou chimisorption puis l'agrégation des enzymes est réalisée par ajout d'agents bifonctionnel tels que le glutaraldéhyde ou le polyéthylène glycol (Basak et al., 2015). Cela conduit à la formation d'amas d'enzymes de taille importante à l'intérieur des pores améliorant ainsi le phénomène de transfert de substrats grâce aux macropores et réduisant la désorption des enzymes retenues par réticulation (Jung et al., 2009). Cette méthode peut aussi être utilisée suite à l'immobilisation à la surface de matériaux non-poreux (cas des nanotubes de carbone) permettant une amélioration des performances enzymatiques (Wee et al., 2019). Récemment, Ayakar et al., ont immobilisé la PGA sur des supports silicatés mésocellulaires (MCF) par physi- et chimisorption et avec et sans réticulation et/ou encapsulation. Les meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'immobilisation des enzymes par chimisorption suivie d'une réticulation avec et sans encapsulation avec 97,8 % de taux d'immobilisation et une activité plus de deux fois supérieure à l'enzyme immobilisée par adsorption et environ 1,5 fois supérieure à celle de l'enzyme immobilisée par chimisorption. Après 4 recyclages des supports, une rétention de l'activité hydrolytique de la pénicilline G de plus de 91% a été observée avec les enzymes immobilisées par chimisorption et réticulation (environ 95% avec encapsulation) contre 38 et 66% pour les enzymes immobilisées par physi- et chimisorption (Ayakar, Yadav, 2019).

Cependant, une perte d'activité peut être observée en présence d'une concentration trop importante de glutaraldéhyde en raison d'une moindre flexibilité de l'enzyme ou bien de la formation de liaisons covalentes entre les résidus d'acides aminés de la cavité catalytique induisant un changement conformationnel (Langen et al., 2002 ; López-Gallego et al., 2013).

#### 1.5 Approches utilisées pour l'intensification de procédés enzymatiques

L'intensification des procédés est une discipline qui a été définie pour la première fois par Stankiewicz et Moulijn en 2000 et qui consiste au développement de méthodes et de dispositifs innovants, qui, en comparaison avec l'existant, offrent une amélioration significative de la

qualité de production et une diminution de la consommation d'énergie, de la production de déchets, et du rapport taille/capacité. Ce dernier point implique une maximisation de la production par unité de taille de réacteur et par unité de temps (Stankiewicz, Moulijn, 2000).

### 1.5.1 Le type de réacteur

L'intensification des réactions enzymatiques est une étape cruciale afin d'envisager une montée en échelle d'un procédé pour assurer sa compétitivité par rapport au procédé existant en augmentant la productivité et en réduisant le plus possible le temps et le coût de mise en œuvre (Sheldon, Woodley, 2018a). A cet effet, plusieurs stratégies peuvent être envisagées telles que la modification de l'enzyme par ingénierie enzymatique et/ou l'optimisation des réacteurs et des conditions opératoires. Afin d'accroître les performances catalytiques, une première approche peut-être la sélection et/ou l'amélioration des enzymes utilisées. Le développement de l'ingénierie moléculaire en particulier celle des protéines a vu une évolution importante ces dernières années, permettant la production d'enzymes avec des performances et résistances exceptionnelles ouvrant les portes au développement industriel de procédés enzymatiques (Iyer, Ananthanarayan, 2008 ; Bommarius et al., 2011 ; Otte, Hauer, 2015 ; Goldsmith, Tawfik, 2017 ; Bernal, Rodríguez, et al., 2018). La deuxième étape est la sélection et le développement du procédé de production le plus adapté permettant d'atteindre une productivité assez importante pour permettre une montée en échelle. L'ingénierie des réacteurs est une filière qui touche tous les domaines et a pour but de développer des réacteurs intensifiés, dont des réacteurs microstructurés, en jouant sur le mode de mise en œuvre (batch/continu, mode de chauffage, mode d'agitation et de mélange, couplage production extraction, ...) et en se basant sur les principes de la dynamique des fluides.

L'exemple le plus répandu de développement de procédés efficaces est l'utilisation des enzymes en continu dans des réacteurs à lit fixe après leur immobilisation sur un support ou sur une membrane, permettant l'obtention du produit pur en sortie du réacteur et de maintenir l'enzyme dans le réacteur (Machado et al., 2017). L'utilisation des réacteurs à lit fixe (RLF) permet de s'affranchir des limitations de transfert du substrat vers l'enzyme en forçant le passage du mélange réactionnel dans les pores du support, ce qui permet une augmentation du taux de conversion et l'accélération de la réaction (Kamble, Yadav, 2017 ; Salvi et al., 2018). De plus, l'optimisation des conditions réactionnelles peut être réalisée en continu et l'enzyme peut être recyclée très facilement sur ce type de système, ce qui rend cette technologie très attractive pour des applications industrielles (Thompson et al., 2019). L'absence ou le faible lessivage de l'enzyme est une condition d'utilisation de cette méthode. Cette technologie

permet aussi l'utilisation ou l'association de plusieurs enzymes, ouvrant la possibilité de réaliser des réactions en cascades d'une efficacité remarquable (Satyawali et al., 2017).

Les réacteurs enzymatiques à lit « fixe » rotatif (i.e. SpinChem®, Suède) sont des réacteurs similaires au RLF qui permettent d'étudier rapidement les performances d'une enzyme immobilisée en mode batch mais avec une maximisation des transferts de matière. Dans ces réacteurs thermostatés, plusieurs compartiments remplis d'enzyme immobilisée sont mis dans une enceinte contenant le mélange de substrat. Lors de la réaction, les compartiments tournent à une vitesse donnée plaquant le catalyseur sur la paroi (grille) par effet centrifuge, ce qui permet d'éviter les chocs entre particules de support d'immobilisation (figure 1.25) (Mallin et al., 2013 ; Szymańska et al., 2017). Cela permet également d'augmenter le coefficient de transfert de matière et ainsi d'améliorer les performances des enzymes immobilisées (Sheldon, Pereira, 2017).



Figure 1.25 : représentation schématique du système de type SpinChem®

L'association de l'utilisation des ultrasons et de l'immobilisation des enzymes est une méthode qui a montré une très bonne efficacité. Les ultrasons provoquent des vibrations à la surface du support ce qui permet de décrocher l'eau présente à la surface du biocatalyseur permettant de contrôler la quantité d'eau disponible pour l'enzyme en retirant le surplus (eau libre) produit lors de la réaction d'acylation. Cela permet une augmentation de l'activité et de la vitesse de la réaction des lipases mises en solvant non-aqueux (Yu et al., 2010 ; Alves et al., 2014 ; Badgajar, Bhanage, 2015 ; Paludo et al., 2015 ; Balen et al., 2015 ; Khan et al., 2015).

La qualité du mélange réactionnel est un paramètre très important lors des réactions enzymatiques afin de contrôler le transfert du substrat vers l'enzyme. Dans les réacteurs agités, l'augmentation de la vitesse d'agitation est souvent accompagnée d'une amélioration de la vitesse initiale de la réaction due à un meilleur transfert externe et interne (Wojtusik et al., 2016). En revanche, ceci peut s'accompagner d'un effet de cisaillement très important qui peut engendrer une perte de stabilité enzymatique et une détérioration du matériau dans le cas d'une catalyse hétérogène avec des enzymes supportées (Noraida et al., 2015). Afin d'améliorer le

transfert de matière et de chaleur en augmentant la surface d'échange entre la paroi du réacteur et le milieu réactionnel et entre ce dernier et l'enzyme, plusieurs types de réacteurs intensifiés microstructurés basés sur une configuration externe et/ou une structuration interne particulière (mélangeur statique, ...) ont vu le jour (Šalić, Zelić, 2018). Ces derniers sont structurés de façon à optimiser le mélange selon les objectifs de mise en œuvre (formation de microémulsion, système biphasique, ...), le régime d'écoulement (laminaire ou turbulent ou chaotique) et la qualité du transfert de chaleur voulu (figure 1.26). Le développement de ces réacteurs nécessite une optimisation des conditions de mise en œuvre, en particulier des flux de substrat qui peuvent influencer de façon considérable les taux de conversion si le temps de contact enzyme / substrat n'est pas maîtrisé (Tišma et al., 2009 ; Marques et al., 2010). L'optimisation de la structure interne du mélangeur statique en modifiant les dimensions de ce dernier (i.e. élargissement d'un côté et rétrécissement de l'autre (figure 1.26.C)), en ajoutant des obstacles (figure 1.26.D) et en contrôlant le flux et la trajectoire d'entrée et de sortie du liquide dans ces structures, permet d'améliorer considérablement les transferts (de matière et de chaleur) en augmentant les collisions au sein du liquide (Znidarsic-Plazl, 2014 ; Solsona et al., 2019). Plusieurs sociétés de développement et production de réacteurs intensifiés sont présentes sur le marché telles que Corning, Chart Industries, NiTech Solutions, AM Technology. Cela a permis le développement et la commercialisation de plusieurs types de réacteurs/échangeurs intensifié plus ou moins facilement extrapolables à l'échelle industrielle tels que le réacteur Corning Advanced Flow qui a présenté de très bonnes performances lors de réactions enzymatiques (figure 1.26.D et tableau 1.6) (Zhang et al., 2017). Ce réacteur se présente sous forme d'un échangeur de chaleur dans lequel le liquide de régulation de la température passe entre des plaques présentant à l'intérieur des structures en forme de cœur, avec un obstacle permettant la collision du mélange de liquide et augmentant ainsi la qualité de ce mélange et le transfert de matière vers le site actif de l'enzyme. D'autres systèmes plus simples ont été décrits (i.e. réacteur Shimtec® de Chart Industries). D'autres réacteurs sont sous forme tubulaire présentant des chicanes qui rentrent en collision avec le liquide, provoquant des oscillations du mélange en plus de l'impact avec le flux de liquide apporté. Les systèmes basés sur ce principe (i.e. réacteur Continuous Oscillatory Baffled™ ou COBR™ de NiTech Solutions) ont montré de très bonnes efficacités lors de l'optimisation de réactions enzymatiques (Elgue et al., 2013). Dans ces réacteurs intensifiés, l'enzyme peut être utilisée libre, immobilisée dans le microréacteur ou sur un support selon l'objectif du procédé (Tudorache et al., 2011 ; Čech et al., 2012 ; Sudar et al., 2013 ; Wei et al., 2018). Les deux dernières catégories permettent la récupération du produit et des substrats

résiduels uniquement, réduisant le coût lié à l'élimination de l'enzyme. Plusieurs exemples de configurations développées pour les réactions enzymatiques sont présentés dans le tableau 1.6.

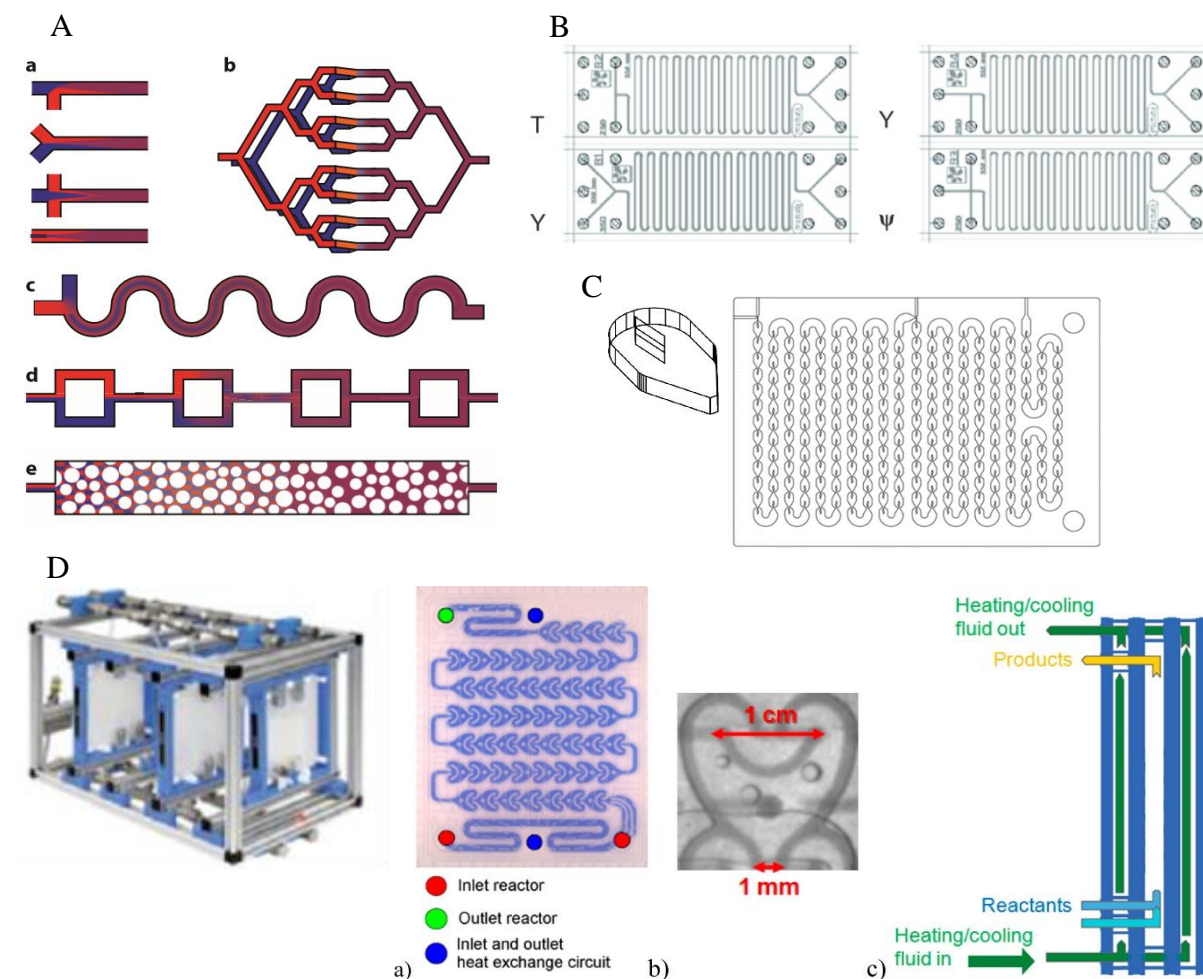


Figure 1.26 : A. représentation schématique de quelques configuration internes de mélangeurs stationnaires : (a) structures simples de mise en contact, (b) structure multi-laminaire, (c) structure courbée ou sous forme d'hélicoïdale, (d) structures en split-recombiné et (e) structure statique périodique (Zhang et al., 2017), B. configuration des microréacteurs simples, C. réacteur microstructuré sous forme de goutte optimisé par Mielke et al., 2018, D. réacteur microstructuré commercialisé sous le nom de Corning Advanced Flow Reactor (a) vue d'ensemble du réacteur avec entré des substrats et enzymes en solution (point rouge), sortie du réacteur (point vert) et entré et sortie de l'échangeur de chaleur (point bleu), (b) structure du mélangeur statique sous forme de cœur, (c) schéma d'une coupe transversale du réacteur (Nieves-Remacha et al., 2012)

Tableau 1-6 : exemples d'utilisation de réacteurs intensifiés





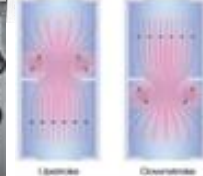
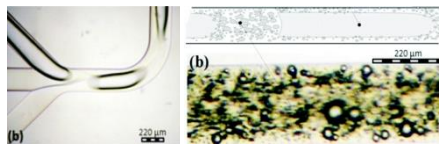
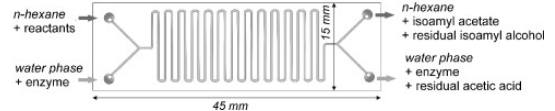
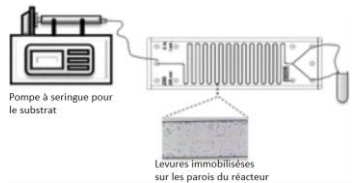

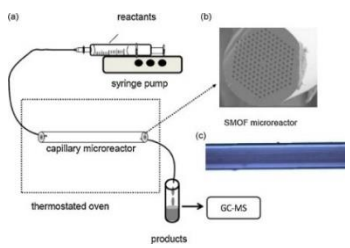
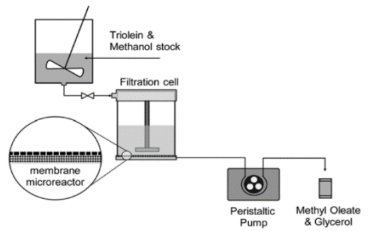
Enzyme	Réaction et milieu	Technologie	Remarque	Réf	
Enzyme libre  Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	Synthèse de l'isoamyle-acétate par estérification en milieu biphasique eau / <i>n</i> -heptane	Système Corning AFR™ Low Flow (LF) 	Augmentation de la surface d'échange enzyme / substrat due à la formation d'émulsion permettant une augmentation de la productivité de plus de 6,5 fois	(Novak et al., 2016)	
	Synthèse de l'éthyle-oléate par estérification en milieu biphasique cyclohexane / tampon phosphate	Comparaison de 3 réacteurs microstructurés : Le système Corning advanced-flow™ reactor (AFR ) (figure 1.26.B)	<p>Le système Shimtec® reactor de Chart Industries</p>   <p>Le système Continuous Oscillatory Baffled Reactor™ (COBR™ ) de NiTech Solutions</p>  	<p>Les 3 premiers réacteurs présentait de bonnes performances. Le transfert de matière était meilleur dans le système Nitech COBR, qui fonctionne par oscillation du liquide au niveau des compartiments, que dans les deux autres permettant de meilleurs taux de conversion.</p>	(Elgue et al., 2013)
		Comparaison des 3 réacteurs précédents avec le réacteur multiétage AM Technology Coflore®			
	Synthèse de l'isoamyle-acétate par estérification en milieu biphasique liquide ionique / <i>n</i> -heptane	Réacteur microstructuré sous forme de Ψ 		Augmentation de la productivité de 3 fois par rapport au batch agité due à la formation d'émulsion en continu sous forme de microchaîne qui augmente la surface d'échange enzyme / substrat et améliore le transfert de matière	(Pohar et al., 2009)

Tableau 1.6 (suite) : exemples d'utilisation de réacteurs intensifiés

Enzyme		Réaction et milieu	Technologie	Remarque	Réf
Enzyme immobilisée	Enzyme libre	Synthèse de l'isoamyle-acétate par estérification en milieu biphasique eau / <i>n</i> -hexane	Réacteur microstructuré sous forme de Y 	Écoulement laminaire des deux fluides Séparation facile des deux phases en sortie Accélération très importante de la réaction	(Žnidaršič-Plazl, Plazl, 2009)
	Alcool déhydrogénase (ADH) et levures productrices	Oxydation de l'hexanol en hexanal puis acide hexanoïque dans de l'hexane	Réacteur microstructuré contenant des enzymes et/ou des levures immobilisées par liaisons covalentes sur les parois du réacteur 	Production en continu sans coproduit à éliminer Maintien de bonnes performances du catalyseur libre	(Šalić et al., 2013)
	Fumarase	Biotransformation de l'acide fumarique en acide malique		(Stojković et al., 2011)	
	CALB	Synthèse du butyle-laurate dans du <i>n</i> -hexane et <i>n</i> -heptane	Microréacteur capillaire formé de fibres microstructurées sur lesquelles CALB est immobilisée par liaisons covalentes 	Production en continu sans coproduit à éliminer 99% de conversion à un temps de séjour de moins de 38 s Système recyclable au moins 7 fois	(Mugo, Ayton, 2010)
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Transestérification de la trioléine avec du méthanol	Enzyme immobilisée dans la structure du filtre 	Activité 3 fois supérieure à celle de l'enzyme libre	(Machsun et al., 2010)	



### 1.5.2 Procédés assistés par micro-ondes

La régulation de la température lors des réactions est l'un des paramètres les plus influents sur les performances catalytiques (taux et vitesse de conversion) et sur la structure de l'enzyme (risque de dénaturation à des températures inappropriées). Plusieurs types de chauffage peuvent être utilisés dont le chauffage conventionnel, réalisé par le transfert d'énergie par conduction d'une source thermique (plaque chauffante, enveloppe de chauffage, résistance, ...) vers la paroi du contenant du milieu réactionnel puis par convection de chaleur de la paroi vers le milieu. Dans ce cas, une température hétérogène peut être observée entre le mélange réactionnel au contact de la paroi et celui au centre du tube causant une activité différente de l'enzyme et induisant une réduction de l'activité et de la vitesse de la réaction. L'augmentation de l'agitation peut permettre un meilleur transfert mais au-delà d'une certaine vitesse d'agitation, il y a une perte d'activité soit par effet de cisaillement induisant une dénaturation rapide ou en réduisant le transfert interne de substrats (de la surface de l'enzyme vers son site actif). Le chauffage non conventionnel consiste à utiliser d'autres sources d'énergie et d'autres méthodes d'agitation moléculaire, c'est le cas du chauffage par les micro-ondes. Les micro-ondes sont des oscillations d'énergie électromagnétique avec des fréquences entre 300 MHz - 300 GHz. Ces dernières engendrent une agitation rapide des molécules ayant un moment dipolaire qui absorbent l'énergie apportée puis la réémettent sous forme de chaleur localisée (au niveau de ces molécules) qui se disperse par la suite dans le milieu, c'est le principe du chauffage diélectrique (Bansode, Rathod, 2018). Par exemple, une fréquence d'irradiation de 2,5 GHz conduit à environ 2,5 milliards de cycles par seconde conduisant à de très importantes frictions et collisions entre les molécules permettant ainsi une très rapide montée de la température interne. Ceci conduit à la réduction de l'énergie d'activation et donc à une accélération des réactions dans le cas des réactions enzymatiques (Réjasse et al., 2006 ; Bhavsar, Yadav, 2018). L'utilisation de cette technologie lors des réactions enzymatiques dans des solvants organiques ou dans des solvants verts tels que l'eau, les liquides ioniques et les solvants eutectiques a déjà été bien décrite dans la littérature (tableau 1.7). Au-delà de l'amélioration de l'activité et surtout de l'accélération de la vitesse initiale de la réaction, un bon maintien de la stabilité des enzymes au recyclage, surtout après immobilisation a été observé (Ziaullah, Rupasinghe, 2013 ; Li et al., 2016 ; Lei Wang et al., 2018).

Tableau 1-7 : exemple d'utilisation des micro-ondes et influence de l'utilisation des réacteurs à micro-ondes sur les performances enzymatiques

Enzyme	Milieu	Réaction	Conditions	Remarque	Réf
iCALB	Sans solvant	Estérification : synthèse isoamyle butyrate	Puissance : 700 W Sans agitation T°C : 60°C	95% conversion (après 120 min) Energie d'activation plus faible que celle avec un chauffage traditionnel et par ultrasons Bonne stabilité au recyclage de l'enzyme	(Bansode, Rathod, 2018)
iCALB	Sans solvant	Estérification : synthèse n-butyl propionate	Fréquence : 2455 MHz Puissance : 50 W T°C : 60°C	92% conversion (après 8 h)	(Bhavsar, Yadav, 2018)
Plusieurs lipases	Tert-butyl methyl ether	Transestérification : synthèse 4'-O-acetyl- resvératrol	Puissance : 400 W T°C : 35°C	Activité plus de 5 fois plus importante avec le micro-onde qu'avec chauffage conventionnel	(Zhi Wang et al., 2018)
iCALB	Toluène	Résolution énantiomérique du (R,S)-flurbiprofène	Puissance : 50 W	Activité 3 fois plus importante avec le micro-onde qu'avec chauffage conventionnel Excellente stabilité des enzymes	(Gupta et al., 2017)
Plusieurs lipases	Tampon Tris-HCl	H trioléine	Différentes températures et puissances	Même activité avec le chauffage micro-onde et conventionnel	(Chen et al., 2016)
iCALB	Toluène	Estérification : synthèse méthyl-oléate	Puissance : 200 W	Accélération de la vitesse de la réaction	(Bukhari et al., 2014)
Estérase d' <i>Aeropyrum pernix</i> K1	n-heptane	Estérification énantiomérique de l'ibuprofène	Puissance : 480 W T°C : 50°C	Activité et énantiosélectivité 21,9 et 1,4 fois, respectivement, plus importantes avec le micro-onde qu'avec chauffage conventionnel Stabilité de l'activité après 5 recyclages	(Yang et al., 2013)
iCALB	Plusieurs liquides ioniques	Transestérification du méthanol avec de l'huile de soja	Puissance : 480 W T°C : 60°C	Effet synergique de l'utilisation des liquides ioniques et de l'irradiation avec les micro-ondes Développement d'un procédé vert	(Yu et al., 2011)
CALB	Butanol	Alcoololyse : synthèse butyl-butyrates	Différentes températures et puissances	Profil d'inactivation très différent de celui avec le chauffage conventionnel (profil linéaire en fonction de la température) Chauffage par micro-ondes : inactivation suivant un profil linéaire en deux étapes dont une inactivation lente à T°C < 90°C et rapide au-delà	(Réjasse et al., 2006)

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

---



## 2 Chapitre II : Matériels et méthodes

### Étude expérimentale

#### 2.1 Biocatalyseurs utilisés

Afin d'atteindre les objectifs de ce travail, deux familles d'enzymes ont été utilisées :

- Les hydrolases : la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) qui est une triacylglycérol acyl hydrolases (EC 3.1.1.3)
- Les acylases : les aminoacylases extraites d'une culture de *Streptomyces ambofaciens*

Pour CALB, Lipozyme 435®, produite par Novozyme Corporation et commercialisée par Sigma, a été obtenue suite à l'immobilisation de la lipase B de *Candida antarctica* sur une résine de méthacrylate divinylbenzène macroporeuse. Elle est commercialisée sous forme de sphères blanches de diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm, avec une activité de 7000 PLU.g<sup>-1</sup> (Propyl Laurate Synthesis) où une unité PLU correspond à la quantité d'enzyme qui permet la transformation d'1 µmol d'acide laurique en laurate de propyle par minute en conditions standards et équimolaires. Sa teneur en eau est de 1 à 2 % (p/p) et sa teneur en protéine enzymatique est comprise entre 1 et 10 %.

CALB a aussi été utilisée sous forme libre, produite par Novozyme et commercialisée par Sigma, dont la composition du milieu est fournie sur la fiche technique (tableau 2.1). Cette dernière a été immobilisée sur différents supports. L'activité de l'eau ( $a_w$ ), des lipases immobilisées commerciales et celles immobilisées lors de cette thèse, a été contrôlée en utilisant la méthode des microclimats en utilisant une solution saturée d'acétate de potassium permettant de maintenir l' $a_w$  au tour de 0,2. L'activité de l'eau a été vérifiée avec un  $a_w$ -mètre Novasina Lab-Master (Basel, Suisse).

Tableau 2-1 : Composition de la solution de CALB utilisée

Ingredients	Approx. % (w/w)
Water, CAS no: 7732-18-5	43.7
Sorbitol, CAS no: 50-70-4	25
Glycerol, CAS no: 56-81-5	25
Lipase, CAS no: 9001-62-1 (*)	6
Sodium benzoate, CAS no: 532-32-1	0.20
Potassium sorbate, CAS no: 24634-61-5	0.10

(\*) Defined as enzyme concentrate (dry matter basis)

Pour les aminoacylases, deux souches de *Streptomyces ambofaciens* ont été utilisées pour la production des aminoacylases :

## Chapitre II : Matériel et méthodes

- *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 : souche sauvage obtenue à partir de l'american type culture collection (ATCC);
- *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877  $\Delta$ SAM23877\_1485::scar $\Delta$ SAM23877\_0977::scar correspondant à la souche sauvage dans laquelle les gènes codants pour l'épsilon lysine acylase (ELA) et la pénicilline V acylase (PVA) ont été éliminés en respectant la phase de lecture. Ces mutants doubles ont été construits et utilisés lors des travaux de Ferrari, 2014, en partenariat avec l'UMR 1128 DynAMic (Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne).

Toutes les souches sont conservées sous forme de spores à -80°C dans une solution de 15-20% de glycérol. Les deux souches ont été cultivées dans les mêmes conditions et l'extrait brut de chaque souche a été obtenu suivant la même procédure.

### 2.1.1 Production des aminoacylases

La culture des *S. ambofaciens* à partir desquelles les aminoacylases sont extraites passe par plusieurs étapes. La première est la germination des spores dans du milieu ICS pendant 48h, à une température de 28°C, sous une agitation de 250 min<sup>-1</sup>. Pour cela, dans une fiole d'Erlenmeyer de 250mL stérile, 100 $\mu$ L de spores sont ensemencés dans 40mL de milieu ICS. Cette étape est suivie par une préculture de la suspension bactérienne obtenue par l'ensemencement du milieu de préculture « Koreishi pH 6,5 » avec 10% (v/v) de la culture précédente (germination). Cette préculture est mise en œuvre pendant 48h dans les mêmes conditions de température et d'agitation que l'étape précédente permettant une croissance bactérienne importante. L'étape finale consiste à la mise en culture des bactéries durant 7 jours, à 28°C et 200rpm suite à l'ensemencement du milieu de culture « Koreishi » avec 3% (v/v) de la préculture. C'est durant cette étape qu'il y a production des aminoacylases par *S. ambofaciens*. Les compositions des différents milieux de cultures utilisés sont présentées dans le tableau 2.2.

Tableau 2-2 Composition des milieux utilisés lors des différentes étapes de culture de *S. ambofaciens*

Milieu	Composition	Concentration (g / L)
ICS (germination)	Saccharose	15
	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	10
	NaCl	3
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
	MgSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,2
	CaCO <sub>2</sub>	1,25
	Cornsteep	5
Koreishi (préculture ; pH 6,5)	Glucose	10
	Dextrines blanches	10
	Extrait de levure	5
	Hydrolysate de caséine	5
	CaCO <sub>2</sub>	1
Koreishi (culture ; pH 7)	Extrait de viande	40
	Amidon soluble	40
	Hydrolysate de caséine	20
	MgSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	20
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2

## 2.1.2 Traitement des surnageants de culture

### 2.1.2.1 Lyse des cellules

Afin d'augmenter le rendement de récupération des protéines intra- et extracellulaires, une lyse des cellules a été réalisée par l'utilisation d'un destructeur de cellule (Constant cell disruption system). La lyse des cellules est réalisée par une succession de cycles de pression / décompression. La suspension de culture de *S. ambofaciens* obtenue subit deux passages au travers de l'appareil à 1500 bars. La séparation des débris cellulaires, résultants du surnageant contenant les protéines d'intérêt, est effectuée par centrifugation à 8200 g, 4 °C pendant 15 min (Avanti 30, Beckman).

### 2.1.2.2 Précipitation des protéines

La précipitation des protéines, présentes dans le surnageant, est réalisée par l'addition de sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à forte concentration qui cause une diminution de la quantité d'eau disponible pour solvater les protéines et leur précipitation. La précipitation est mise en œuvre en présence de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 60% de la saturation sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. Les protéines précipitées sont ensuite récupérées par centrifugation à 8200 g, à 4 °C, pendant 20 min (Avanti 30, Beckman) puis resolubilisées dans du tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8.

### 2.1.2.3 Diafiltration et concentration des protéines

L'extrait protéique obtenu, suite à la précipitation des protéines, est très riche en sulfate d'ammonium, et la concentration en protéine est faible (environ 2 g/L). Pour éliminer la présence des sels, il a été nécessaire de réaliser une étape de diafiltration et concentration de la solution protéique. Ces étapes ont été réalisées en utilisant un système d'ultrafiltration tangentielle sur un pilote Cogent®  $\mu$ Scale (Millipore, Molsheim, France) équipé d'une cassette formée d'un empilement de membranes planes en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 10 kDa. Le but de la diafiltration est d'éliminer le maximum de sels dans le perméat, suivi par un conductimètre, et de récupérer le maximum de protéines dans le retentât. Elle consiste à maintenir constant le volume du retentat en ajoutant du tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8. 4 diavolumes ont été réalisés (un diavolume = le volume récupéré dans le perméat et le même que le volume de la solution initiale à dia-filtrer). La concentration de la solution diafiltrée est réalisée en arrêtant l'apport en tampon pour le maintien du volume. L'arrêt de la concentration est effectué lorsqu'il y a une fluctuation importante de la pression transmembranaire (différence de pression entre l'entrée et la sortie de la membrane) et / ou diminution importante du débit du perméat, signe d'un colmatage de la membrane.

Lors de la production de petits volumes (inférieur à 500 mL) d'enzymes la même procédure est suivie (dia-filtration et concentration) en utilisant un petit système d'ultrafiltration tangentielle qui se présente sous forme d'un tube Falcon® équipé d'une membrane en cellulose régénérée de 10 kDa (système Amicon Ultra-15 ; Millipore, Billerica, MA, EtatsUnis). Elle est réalisée par centrifugation d'un volume, de 0 à 15 mL maximums, de la solution à concentrer, déposé dans le compartiment « rétentat », pendant 30 min à 5000 g à température ambiante (20°C).

### 2.1.3 Expression hétérologue des aminoacylases de *S. ambofaciens* chez *E. coli* Origami B (DE3)

L'expression hétérologue des aminoacylases de *S. ambofaciens* a été réalisée en utilisant comme hôte la souche d'*E. coli* Origami B (DE3), qui dérive d'un mutant lacZY d'*E. coli* BL21 (DE3). Les mutations qui sont présentes dans cette souche au niveau de la thiorédoxine réductase (trx B) et des gènes de la glutathion réductase (gor) sont sélectionnables respectivement sur kanamycine et tétracycline et permettent d'améliorer considérablement la formation des ponts dissulfures dans le cytoplasme. La transformation est réalisé par introduction par électroporation du plasmide pET-15b (figure 2.1) sur lequel les gènes codant pour les aminoacylases de *S. ambofaciens* (Sam ELA, Sam PVA ou Sam AA) sont insérés (les plasmides pET-15b/Sam ELA, pET-15b/ Sam PVA ou pET-15b/ Sam AA, respectivement). La



## Chapitre II : Matériel et méthodes

culture est réalisé dans le milieu Luria-Bertani (LB, Sigma-Aldrich) soit liquide ou gélosée par addition d'agar-agar à 15 g/L. La sélection des souches transformés se fait dans du milieu LB contenant 50 µg/mL de kanamycine, 12,5 µg/mL tétracycline et 100 µg/mL d'ampicilline.

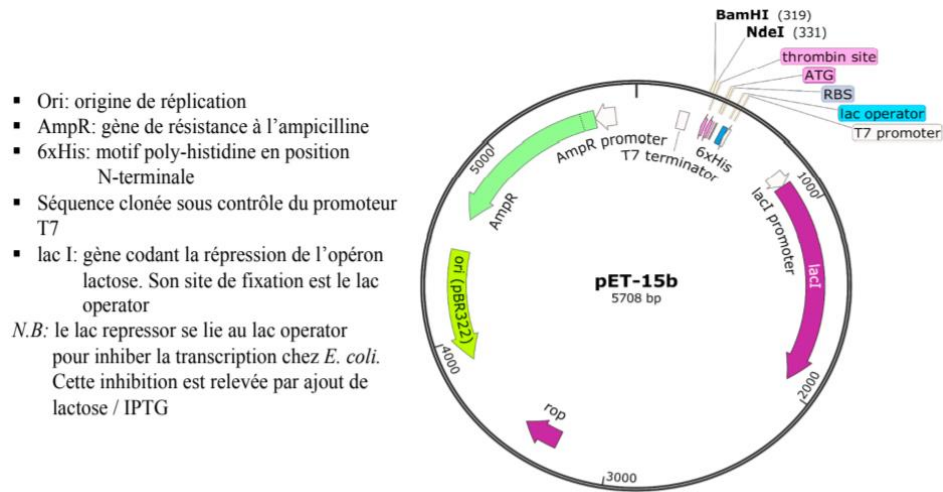


Figure 2.1 : carte plasmidique de pET-15b avec ses principales caractéristiques

Initialement, une préculture d'une nuit à 37°C et 200 rpm des différentes souches transformées ou pas (100 µL de cellules en suspension) a été réalisé dans tubes Falcon 15 mL contenant 6 mL du milieu LB avec les 3 antibiotiques (le milieu de culture avec *E. coli* Origami B (DE3) non transformée ne contenait pas d'ampicilline). Une fois la densité optique (DO 600 nm) a été proche de 0,05, la culture est lancée en inoculant les souches dans 250 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline puis incubées à 37°C et 200 rpm jusqu'à une DO entre 0,6 et 0,9. L'expression protéique a été ensuite initiée par ajout de 0,1 mM d'IPTG et les cultures sont incubées directement à 16°C. Le suivie de la croissance cellulaire a été réalisé en mesurant la DO 600 nm des prélèvements (1 mL) de milieu de culture après induction et jusqu'à l'arrêt de culture (18h – 20h après induction). Les prélèvements ont été conservés (-20°C) pour l'analyse ultérieure des protéines. Les cellules sont récupérées après la culture par centrifugation (8000 rpm, 4°C, 10 min ; Centrifuge 5804 R, Eppendorf) puis le culot été lavé avec du tampon Tris HCl 25mM, NaCl 50 mM, pH 8 (50 mL), centrifugé dans les mêmes conditions et suspendu dans 25 mL du même tampon.

Les cellules en suspensions ont été lysées en utilisant la presse de French (1 passage à 2 Kbar), et les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (11000 rpm, 20 min, 4°C ; Centrifuge 5804 R, Eppendorf). Les protéines solubles présentent dans le surnageant ont été concentrées 10X par ultrafiltration dans des systèmes de filtration Amicon Ultra-15 10KDa (Millipore) en réalisant des séries de centrifugation (4000g, 4°C, 15 min.). La concentration des protéines de

## Chapitre II : Matériel et méthodes

l'extrait brut a été déterminée par la méthode Bradford et BCA (BiCinchoninic acid Assay) qui seront présentés ultérieurement. L'activité spécifique et la régiosélectivité des protéines de l'extrait brute des souches transformées ou pas a été déterminée sur la base de l'activité hydrolytique du N- $\alpha$ / $\epsilon$ - acétyl-L-lysine en utilisant de 100 à 500  $\mu$ L de fraction protéique. La réaction d'hydrolyse mise en œuvre et la méthode de quantification du produit de la réaction seront présentées ultérieurement.

La purification des protéines recombinantes a été réalisée à partir de l'extrait protéique concentré issu de la culture d'E. coli Origami B (DE3) transformé avec le plasmide pET-15b / SamAA en utilisant la chromatographie d'affinité aux ions métalliques immobilisés (IMAC). La colonne (HisTrap Excel ; GE healthcare) contenant le Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) immobilisé sur la phase stationnaire permettant la rétention de la queue poly-histidine (étiquette his-6) ajoutée à la protéine recombinante SamAA. L'équilibration de la colonne, le lavage et l'élution ont été réalisés avec du tampon Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8 en présence d'imidazole à différentes concentrations (20 mM, 80 mM, 160 mM et 250 mM). La concentration et l'élimination de l'imidazole présent dans les fractions éluées ont été effectuées par ultrafiltration avec le système Amicon Ultra-15 (4000g, 4°C, 15 min). Les protéines ont été précipitées dans de l'acétone 80% (-20 °C, 60 min) puis centrifugées (10000 rpm, 0 °C, 20 min) et le culot a été séché à l'azote gazeux avant de réaliser l'analyse des protéines par SDS-PAGE. Les protéines issues des différentes transformations ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE), par migration verticale. La composition des gels, tampons et solutions utilisées sont décrites dans le tableau 2.3.

Les échantillons sont standardisés en fonction de la DO<sub>600nm</sub> de la culture bactérienne, selon la formule suivante  $V_{\text{tampon dénaturation}} (\mu\text{L}) = \frac{\text{DO}_{600\text{nm}}}{0,6 \times 20}$  avant dénaturation à 100°C pendant 10 min. 15  $\mu$ L du marqueur de taille, et 25  $\mu$ L de chaque échantillon ont été déposés dans les puits. La migration a été effectuée à 120 V constant pendant 1h 30min (Mini-PROTEAN II, Bio-Rad) puis les gels ont été placés dans la solution de révélation sous agitation, pendant une nuit. La décoloration a été réalisée avec une solution d'acide acétique/ méthanol/ eau (10/40/50, v/v/v). Les gels ont été stockés dans une solution aqueuse à 5% (v/v) d'acide acétique.

Tableau 2-3 : Composition des gels et solutions utilisés pour les SDS-PAGE

	Constituants	Quantité
Gel de séparation à 12,5% d'acrylamide	Solution d'acrylamide	4,15 mL
	Eau distillée	3,25 mL
	Tampon Tris HCl pH 8,8	2,5 mL
	Solution SDS à 10%	100 µL
	Persulfate d'ammonium 10%	50 µL
	TEMED	5 µL
Gel de concentration à 4% d'acrylamide	Eau distillée	6,1 mL
	Solution d'acrylamide	1,3 mL
	Tampon Tris HCl pH 6,8	2,5 mL
	Solution SDS à 10%	100 µL
	Persulfate d'ammonium 10%	50 µL
	TEMED	10 µL
Tampon de dénaturation (Laemmli)	Eau distillée	3,55 mL
	Tampon Tris HCl pH 6,8	1,25 mL
	Glycérol	2,5 mL
	Solution SDS à 10 %	2 mL
	Bleu de bromophénol	1 mg
	β-mercaptoéthanol	500 µL
Tampon de migration pH 8,3	Tris base	3 g.L-1
	Glycine	14,4 g.L-1
	SDS	1 g.L-1
Solution de révélation	Méthanol	50 %
	Acide acétique	10 %
	Eau distillée	40 %
	Coomassie R-250	1 g.L-1

## 2.2 Immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* et de CALB

L'évaluation des performances d'enzymes immobilisées sur différents supports poreux à base de silice, développés en partenariat avec le Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM) de Nancy du Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP) et la collaboration de l'Institut Jean Lamour (IJL), pour le développement de supports à base de carbone, entre dans les prorogatifs de la tâche 1 du projet ANR ISEAPIM3 (ANR-15-CE07-0023) : « Intensified & Sustainable Enzymatic Acylation Processes on Innovative Macroporous / Mesoporous Materials ». L'objectif principal est de développer un support le plus compétitif possible au support commercial pour CALB et d'immobiliser les aminoacylases produites par *S. ambofaciens*. Pour y parvenir, des supports non poreux carbonés (nanotubes de carbone) et poreux siliceux de différentes porosités, mésoporeux (SBA15), méso-macroporeux et macroporeux (siHIPE) ont été utilisés pour l'immobilisation par physisorption ou par chimisorption en utilisant différents greffons. Des supports à base de carbone ont aussi été produits et fonctionnalisés par le

laboratoire de l'IJL et utilisés pour l'immobilisation des lipases par physisorption et chimisorption. La méthodologie est décrite dans l'article « Non-covalent and covalent immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on chemically modified multiwalled carbon nanotubes for a green acylation process in supercritical CO<sub>2</sub> »

### 2.2.1 Synthèse des matériaux à base de silice

Les SBA15 (Santa Barbara Amorphous 15) et les supports méso-macroporeux ont été produits en collaboration avec le laboratoire L2CM. Les SBA15 ont été synthétisés suivant un procédé sol-gel (ou solution-gélification) en pH acide (acidifiés avec du HCl 1M) en présence du P123 (Poly(éthylène glycol)-block-poly(propylène glycol)-block-poly(éthylène glycol)) comme tensioactif structurant et du tétraméthylorthosilicate (TMOS) comme précurseur de la silice. Le mélange est mis sous agitation à 40 °C pendant 24 h puis à 100 °C pendant 48 h. Dans ces conditions, il y a hydrolyse et polycondensation du précurseur TMOS en dehors de micelles formées par le P123. Ensuite, des lavages successifs à l'éthanol sont réalisés afin d'éliminer le tensioactif et libérer la porosité de la silice.

Les supports siliceux méso-macroporeux (MMS) ont été synthétisés suivant la démarche décrite par Blin et al., (2006). Ils sont fabriqués à partir d'une nano-émulsion formée en mélangeant des surfactants fluorés préparés dans de l'eau à pH proche de 0 et à 40°C avec du perfluorodecaline comme phase huileuse sous agitation. Après une nuit de repos, une quantité de TMOS (1 mole / 0,5 mole du surfactant) est ajoutée et le mélange est mis sous agitation à 40°C pendant 1 h. Un traitement hydrothermal est ensuite effectué dans un autoclave à 100°C pendant 24 h. Le produit final est récupéré après extraction du surfactant avec de l'éthanol dans un Soxhlet pendant 48h, suivi d'un séchage à température ambiante pendant 24 h.

Les supports macroporeux (SiHIPE) ont été produits par le CRPP suivant la méthode décrite par Backov, (2012). Ils sont synthétisés à partir d'une émulsion huile (Dodécane) dans une phase aqueuse formée de tétraéthoxysilane (TEOS) préparée dans une solution de bromure de tétra-décyl-triméthyl-ammonium (TTAB) en condition acide. La polycondensation du squelette inorganique est réalisée en laissant vieillir pendant une semaine, puis quatre jours de rinçage avec un mélange tétrahydrofurane / acétone (50/50 v/v) pour extraire la phase huileuse présente dans le matériau.

### 2.2.2 Fonctionnalisation des matériaux

Lors de l'étude de l'influence du taux d'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) sur l'activité et la stabilité des aminoacylases de *S. ambofaciens* par physisorption, les supports SBA15 et MMS

synthétisés ont été fonctionnalisés en faisant varier la proportion molaire d'APTES à celle des supports. Il est possible d'obtenir plusieurs taux de fonctionnalisation des groupements organiques dans la silice. Celui-ci est calculé selon la formule :  $\tau = \text{nombre de moles APTES} \times 100 / (\text{nombre de moles APTES} + \text{nombre de moles de silice})$  sachant que la masse molaire de l'APTES est de 221 g / mole et celle de la silice (SiO<sub>2</sub>) est de 60 g / mole. La fonctionnalisation est réalisée dans du toluène (50 mL / g de support) et mise sous agitation à 110°C pendant une nuit. Le mélange est ensuite filtré et le support récupéré et lavé deux fois avec du toluène puis de l'éthanol avec le même volume du mélange filtré à chaque lavage.

Les lipases ont été aussi immobilisées par physisorption et chimisorption sur des SBA15. La fabrication du support et l'immobilisation ont été réalisées par nos partenaires au L2CM. L'immobilisation par physisorption a été effectuée sur les SBA15 fonctionnalisés avec du triéthoxy(phényl)silane à 5% molaire. L'immobilisation par chimisorption sur les SBA15 a été réalisée en utilisant plusieurs groupements organiques permettant la formation de liaisons covalentes entre le support et l'enzyme. Les supports ont été fonctionnalisés avec du glutaraldéhyde, de l'isocyanate et du glymo (3-glycidyoxypropyl-triméthoxysilane). Afin de pouvoir greffer ces groupements, une pré-fonctionnalisation avec de APTES est réalisée. En générale, lors de l'immobilisation, il y a formation d'une liaison imine avec une amine libre présente à la surface de l'enzyme en particulier celui de la lysine. Le taux de fonctionnalisation du groupement organique dépend du taux de fonctionnalisation initiale avec l'APTES. Les supports finaux qui serviront à l'immobilisation sont obtenus en mettant en contact le groupement organique avec le support dans un tampon Tris (tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane).

Pour les supports macroporeux, la fonctionnalisation s'effectue par imprégnation, à température ambiante, de la solution contenant le groupement organique dans du chloroforme, pendant 3 jours, suivi d'un rinçage avec du chloroforme, de l'acétone puis de l'eau durant 3 jours. Ceci permet l'élimination des résidus du précurseurs TEOS (Backov, 2012b).

### 2.2.3 Immobilisation des enzymes

Avant l'immobilisation des lipases, la solution commerciale a été standardisée afin d'éliminer les conservateurs qui peuvent perturber l'immobilisation. Cette dernière a été diluée trois fois afin de réduire la viscosité puis filtrée dans des tubes d'ultrafiltration (Amicon), de 10 kDa, en réalisant une centrifugation pendant 40 min à 4000 g. Le volume, récupéré dans le rétentat, est

dilué par 10 dans du tampon Tris puis centrifugé pendant 20 min suivant les conditions précédentes. A la fin, le concentrât protéique est repris dans le tampon d'immobilisation.

L'immobilisation sur les SBA15 et les MMS a été réalisée en mettant en contact les enzymes avec les différents supports dans un tampon TRIS-HCl 25 mM, NaCl 50 mM (pH8). L'immobilisation des lipases par chimisorption, s'est faite par une mise en contact pendant 3h à température ambiante et une agitation de  $250 \text{ min}^{-1}$ . Pour les aminoacylases de *S. ambofaciens* immobilisés par physisorption, une mise sous agitation pendant 18h à  $4^\circ\text{C}$  sous une agitation rotatoire  $150 \text{ min}^{-1}$  a été nécessaire afin d'éviter la dénaturation de l'enzyme. Les mélanges sont ensuite filtrés et rincés deux fois avec le même tampon d'immobilisation et laissés sécher une nuit à l'air libre. L'immobilisation sur les supports monolithique (SiHIPE) a été réalisée suivant les mêmes étapes en continu dans un réacteur à lit fixe. Pour l'immobilisation des lipases par chimisorption sur les supports fonctionnalisés avec du Glymo, la solution enzymatique a été préparée dans un tampon Tris à forte molarité (1M) afin de permettre une bonne ouverture des cycles epoxy, permettant de meilleures interactions et une immobilisation plus importante (figure 2.2).

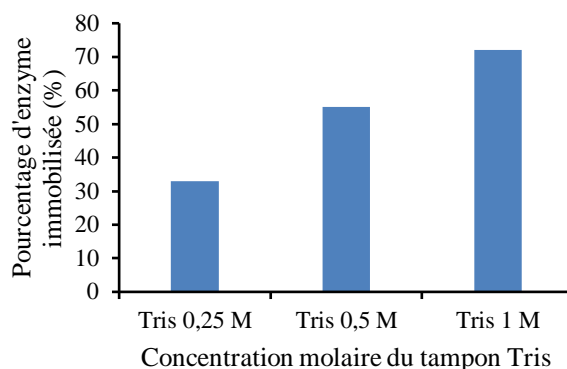


Figure 2.2 : influence de la concentration du tampon par rapport à la concentration d'enzyme initiale sur le pourcentage d'immobilisation

La formation des CLEAs (cross linking enzyme aggregate) à la surface des SBA15 a aussi été réalisée. Pour cela, différents taux de glutaraldéhyde (1, 5 et 10 % molaire par rapport au nombre de moles de silice utilisée) ont été utilisés. Les différentes quantités nécessaires de glutaraldéhyde ont été mélangées avec des SBA15 fonctionnalisés à 50% d'APTES sur lesquelles les aminoacylases ont été immobilisées. Le mélange a été mis sous agitation pendant 18h puis filtré et lavé avant de le mettre à sécher pendant une nuit à l'air libre.

### 2.2.4 Caractérisation des matériaux

Les propriétés physiques et chimiques des SBA15 et les MMS avant et après fonctionnalisation et immobilisation ont été caractérisées par plusieurs méthodes. La détermination de la surface spécifique des matériaux, avec la méthode BET (Brunauer, Emmett et Teller), la distribution du diamètre des pores, par la méthode BJH (Barrett, Joyner et Halenda), et le volume poreux par la méthode d'adsorption-désorption d'azote. La diffraction des rayons X aux petits angles (ou SAXS, Small Angle X-ray Scattering) a été utilisée pour déterminer la structure et l'organisation des différents supports silicatés et pour la détermination de la distance de Bragg ( $d_{100}$ ) qui correspond à  $2\pi/l'$  angle de réflexion du premier pic et de paramètre de maille  $a_0 = 2 \times d_{100} / \sqrt{3}$  permettant de revenir à l'épaisseur de la paroi des méso-pores après soustraction du diamètre des pores déterminé par la méthode BJH. La détermination de la porosité au mercure a été utilisée afin de visualiser la distribution de taille des pores des supports méso-macroporeux et macroporeux. Enfin, lors de l'immobilisation des aminoacylases par physisorption sur les supports SBA-15 et MMS, l'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) du silicium et du carbone a permis de vérifier la bonne fonctionnalisation et l'immobilisation des enzymes par l'apparition des pics correspondant à ces derniers.

### 2.2.5 Autres types d'immobilisation

Les aminoacylases ont aussi été immobilisées par encapsulation dans une émulsion double. Elle consiste à piéger les enzymes, préalablement solubilisées dans du tampon Tris pH 7,6, en les introduisant dès le départ dans une émulsion formée de dodecane, de polyricinoléate de polyglycérol (PGPR). L'émulsion est formée par l'utilisation d'un ultraturrax à  $24000 \text{ min}^{-1}$ , et la deuxième, en versant, goutte à goutte, le premier mélange dans une solution aqueuse de P123 (5% massique). L'émulsion double ainsi formée est dispersée dans du tampon Tris pour la diluer puis 1 mL de silicate est ajouté sous condition acide. La minéralisation est réalisée pendant une nuit suivie d'un séchage afin de récupérer une poudre.

## 2.3 Mise en œuvre des réactions enzymatiques

Les réactions enzymatiques ont été réalisées dans différents types de réacteurs. L'évaluation des performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* libres et immobilisées a été réalisée dans des réacteurs batch de différents volumes. L'évaluation des lipases (CALB immobilisée commerciale, Lipozyme 435, et CALB immobilisée sur les différents supports) pour les réactions d'acylation a été mise en œuvre dans des réacteurs batch et continus. Dans ce cas la réaction de N-acylation des acides aminés avec CALB, les réacteurs en batch ont servi pour

l'évaluation des performances enzymatiques dans le solvant organique 2-méthyl-2-butanol, les solvants eutectiques et les milieux biphasiques alors que les réactions continues ont été réalisées pour l'évaluation de l'activité sous CO<sub>2</sub> supercritique. La réaction de O-acylation du géraniol avec l'acide acétique a été utilisée pour l'évaluation des performances de CALB immobilisée sur les différents supports et commercial (Lipozyme 435) en continu sous scCO<sub>2</sub>.

### 2.3.1 Réactifs utilisés

Tableau 2-4: réactifs utilisés lors des réactions enzymatique

Produit	Pureté (%)	Fournisseur
L-Acides aminés	Entre 97 et 99	Sigma-Aldrich
Acide caprylique	98	Sigma-Aldrich
Acide undécénoïque	99	Sigma-Aldrich
Acide laurique	99	Sigma-Aldrich
Acide oléique	99	Sigma-Aldrich
N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine	99	Sigma-Aldrich
N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine	99	Sigma-Aldrich
2-méthyl-2-butanol	99	Sigma-Aldrich
Triéthylamine	99	Sigma-Aldrich
Trizma Base	99	Sigma-Aldrich
NaCl	99	Bachem
Choline chloridium	98	Sigma-Aldrich
Urée	97	Sigma-Aldrich
Glycérol	99	Sigma-Aldrich
Décane	99	Sigma-Aldrich
Hexane	95	Sigma-Aldrich
Acide acétique	99,8	Sigma-Aldrich
Géraniol	97	Sigma-Aldrich
Méthyl décanoate	99,5	Sigma-Aldrich
Acétone	99,8	Carlo Erba

### 2.3.2 Réactions en continu sous CO<sub>2</sub> supercritique (scCO<sub>2</sub>)

Les réactions sous scCO<sub>2</sub> ont été réalisées avec des enzymes immobilisées dans un réacteur à lit fixe selon la figure 2.3. L'installation comporte une bouteille d'alimentation en CO<sub>2</sub> gaz (60 bars) équipée d'un tube plongeur d'alimentation. Le CO<sub>2</sub> est ensuite pompé et amené sous forme liquide, suite à un passage par un cryostat, en utilisant une pompe à CO<sub>2</sub> liquide (Jasco, Japon) puis par un bain chauffant vers une étuve tous deux régulées à la température du scCO<sub>2</sub> voulue (supérieure à 32°C). Au niveau de l'étuve, le scCO<sub>2</sub> rentre en contact avec les substrats, apportés par les pompes, permettant d'avoir des débits minimaux très faibles (minimum 2  $\mu$ L / min), au niveau d'un T (Valco) résistant à des pressions allant jusqu'à 350 bars. Le mélange scCO<sub>2</sub>/ substrat est homogénéisé par passage à travers un mélangeur statique, avant d'atteindre



## Chapitre II : Matériel et méthodes

le réacteur à lit fixe d'un volume de 1,3 mL ou 5 mL contenant les enzymes immobilisées seules ou mélangées avec des billes en verre de 0,6 mm de diamètre moyen afin de compléter le volume. Le contrôle de la pression s'effectue à l'aide d'un régulateur de pression ou Back pressure regulator (BPR; Jasco, Japon) équipé d'un brise jet permettant de récupérer efficacement les produits formés et les substrats résiduels. Les débits d'alimentation en scCO<sub>2</sub> et en substrats des différentes pompes ainsi que la pression du BPR et donc du scCO<sub>2</sub> ciblée sont contrôlées par le logiciel ChromNav (Jasco, Japon).

Lors des réactions de synthèse de l'acétate de géraniol à partir de l'acide acétique et du géraniol en concentration équimolaire (57 mM), le mélange de substrat est préalablement réalisé et pompé à un débit de 40 µL / mn afin d'éviter un déséquilibre d'alimentation en substrats et fausser les résultats.

Lors de l'évaluation des performances des lipases immobilisées sur les différents supports, un réacteur court de 1,3 mL de volume a été utilisé. Ce dernier était connecté au niveau de l'installation en vérifiant l'étanchéité assurée par des férules adaptées. La montée en pression est progressive avec contrôle de l'étanchéité tous les 50 bars. Le CO<sub>2</sub> est pompé sur une base liquide à -8°C à un débit de 3 mL/min et expansé en passant d'une température de -8°C à la température de consigne de 55°C pour devenir supercritique en maintenant une pression finale de 200 bars. Le temps de séjours des mélanges réactionnels obtenus est de l'ordre de 8 secondes dans le réacteur court. Les réactions sont réalisées pendant 30 min. Le mélange de substrats et produits est récupéré au cours de la réaction et le scCO<sub>2</sub> s'évapore directement en contact avec l'air. Une fois la réaction finie, une dépressurisation rapide de l'installation est réalisée en passant directement de la pression de la réaction à la pression atmosphérique.

L'évaluer de l'activité de CALB commerciale immobilisée sur des supports de méthacrylate divinylbenzène macroporeux (Lipozyme<sup>®</sup> 435) a aussi été réalisé dans le même système et dans des conditions similaires. L'influence des conditions de pression et de température du scCO<sub>2</sub> sur l'activité enzymatique a été mesurée en utilisant un plan d'expérience factoriel simple à deux facteurs, deux niveaux avec point central additionnel. Dans ce cas les conditions réactionnelles étaient les mêmes mais avec une variation de la température entre 45 et 65°C et de la pression entre 150 et 300 bars. L'évaluation de l'influence de la configuration et de la mise en œuvre du réacteur a été réalisée en utilisant des réacteurs de différentes longueurs de même diamètre utile de 0,46 cm (volume de 1 mL avec 300 mg de billes et 5mL avec 1500 mg de bille) ou bien en mettant des réacteurs courts de 1 mL en parallèle pour simuler un réacteur de même longueur mais de diamètre double (2\*300 mg=600 mg de billes) dont nous ne

dispositions pas. L'influence du temps de séjour des substrats dans le réacteur a été évaluée en utilisant le réacteur de 1 mL à 55°C et 200 bars. Les réactions ont été mises en œuvre à des débits de CO<sub>2</sub> entre 0,5 et 6 mL / min. La stabilité des enzymes immobilisées au cours du temps a été réalisée dans les conditions standards, décrites dans le paragraphe précédent, durant 24 h avec des prélèvements dans le temps. 6 cycles de dépressurisation ont été réalisés afin de contrôler leur stabilité.

Tous les échantillons prélevés sont dilués cinq fois dans de l'acétone puis 50 µL de méthyle décanoate est ajouté comme étalon interne avant les analyses en chromatographie en phase gazeuse (GC).

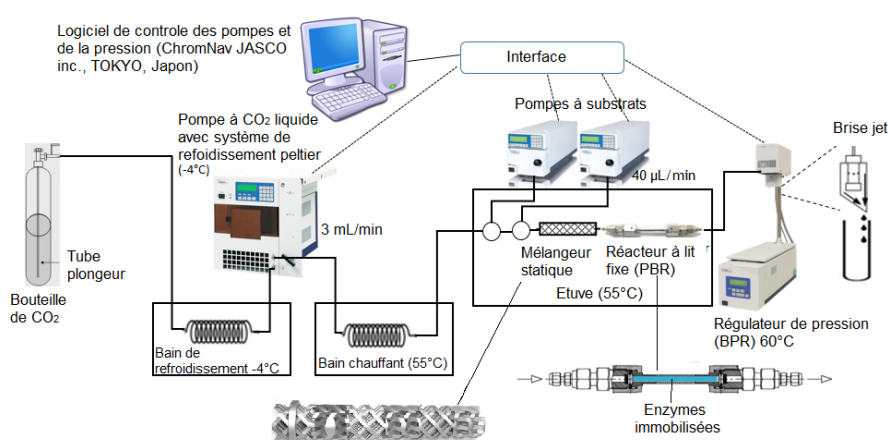


Figure 2.3: Equipements utilisés pour la mise en œuvre des réactions enzymatiques sous scCO<sub>2</sub> dans les conditions standards

### 2.3.3 Réaction en batch dans des réacteurs agités mécaniquement

#### 2.3.3.1 Synthèse enzymatique

##### 2.3.3.1.1 Solvant organique en réacteur agité

L'acylation enzymatique des acides aminés a été réalisée dans différents milieux réactionnels. L'acylation des acides aminés (0,12 M) par l'acide undécénoïque (0,24 M) a été réalisée dans 2 mL de 2-méthyl-2-butanol (M2B2) comme solvant organique, préalablement déshydraté sur tamis moléculaires 4Å. 2,4 mol L<sup>-1</sup> de la triéthylamine ont été ajoutée au milieu réactionnel afin de favoriser la forme neutre du groupement amine (Husson et al., 2010b). Le mélange est mis sous sonication 2,5 min à 200 W de puissance de l'appareil ULTRASONIC PROCESSOR (Bioblock Scientific, Thermofisher) puis laissé agiter une nuit à 55°C et 250 min<sup>-1</sup>, pour mieux solubiliser l'acide aminé, dans un Carrousel 12 Plus Reaction Station™ équipé d'un barreau aimanté et thermo régulé. 10 g/L de Novozym 435® (CALB) sont ensuite ajoutés pour démarrer la réaction. Les réactions sont mises en œuvre à 55°C et 500 min<sup>-1</sup>. Des échantillons sont prélevés toutes les 24 h puis dilués 10 fois avec de l'eau/méthanol (80/20, v/v), filtrés afin

d'éliminer CALB puis analysés en LC-MS-MS. les réactions ont été répétées au minimum deux fois.

Des réactions en mélange eutectique profonds (MEP) ont aussi été réalisées. Le MEP formé de sel d'ammonium avec son contre ion, chlorure de choline, et les donneurs de liaison hydrogènes, urée et glycérol, ont été préparés à un ratio molaire de 1 / 2. Le mélange, solide, est mis sous agitation en reflux pendant 2 h à 60°C. Le mélange liquide obtenu est équilibré jusqu'à une activité de l'eau,  $a_w$ , de 0,2 avant de lancer la réaction dans les mêmes conditions qu'avec le M2B2. La régulation de l' $a_w$  permet une réduction importante de la viscosité.

Des milieux biphasiques ont aussi été réalisés. Ils sont formés par un mélange contenant 50% d'un solvant organique décane et hexane, dans lequel l'acide gras (AG) a été dissout, et 50% de tampon Tris Base 0,1 M dans lequel l'acide aminé (AA) a été solubilisé. Différentes concentrations de substrat ont été évaluées ratio constant AG/AA de 2/1. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 4 mL (2 mL de chaque partie) en présence de différentes concentrations de CALB liquide à 55°C et 1000 min<sup>-1</sup> d'agitation.

### 2.3.3.1.2 En milieu aqueux

La réaction de N-acylation des acides aminés, avec différents donneurs d'acyles, a été réalisée dans des tubes à vis équipés de barreaux aimantés et chauffés dans un bain d'huile par une plaque chauffante thermo régulée (IKA). L'émulsion de substrats en condition équimolaire (0,1 / 0,1 d'AG / AA) est préparée dans un tampon Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM pH8 par sonication pendant 2,5 min à 40 % de la puissance maximum. Les réactions sont lancées par l'ajout des aminoacylases de *S. ambofaciens*, libres ou immobilisées (1 g/L), pour un volume réactionnel final de 2 mL. Les réactions sont réalisées à 45°C avec une agitation magnétique de 500 min<sup>-1</sup>. Les échantillons prélevés sont dilués par 5 ou par 10 dans un mélange méthanol/eau (80/20) puis filtrés avant d'être analysés par CLHP ou LC-MS-MS.

Des réactions d'acylation de la phénylalanine avec l'acide 10-undécénoïque ont aussi été mises en œuvre en utilisant deux autres types de réacteurs dont un réacteur Wheaton® d'une capacité de 50 mL et un réacteur Optimax® de d'une capacité de 1 L. Le réacteur Wheaton® est équipé d'un barreau aimanté suspendu évitant des cisaillements importants avec l'enzyme au cours des synthèses (figure 2.4.A). Une plaque chauffante (IKA) est utilisée pour le maintien de la température à 45 °C, par l'intermédiaire d'un bain d'huile thermostaté. Le réacteur a été rempli à un volume de 10 mL ou de 20 mL lors des réactions de N-acylation.

Le réacteur Optimax® (MettlerToledo) est équipé d'une agitation mécanique assurée par une pale Rushton, une sonde de température et de pH et un système de reflux permettant d'éviter l'évaporation (figure 2.4.B). Le système est entièrement automatisé et contrôlé par le logiciel. Une fois le mélange de substrats introduit dans la cuve (volume final 300 mL), l'appareil préalablement programmé démarre automatiquement l'agitation à 700 min<sup>-1</sup> puis régule la température, par chauffage d'une chemise de régulation de température qui entoure la cuve, et le pH du milieu réactionnel par injection progressive (toutes les 10 secondes), à l'aide d'une pompe-seringue, d'une certaine quantité soit de NaOH 1 M ou de HCl 1 M jusqu'à atteindre le pH 8. Une fois la régulation finie, le volume nécessaire d'enzyme pour atteindre la concentration cible est ajoutée afin de commencer la réaction. L'évolution du pH, de la température et de la vitesse d'agitation est suivie par le logiciel lors de la réaction.

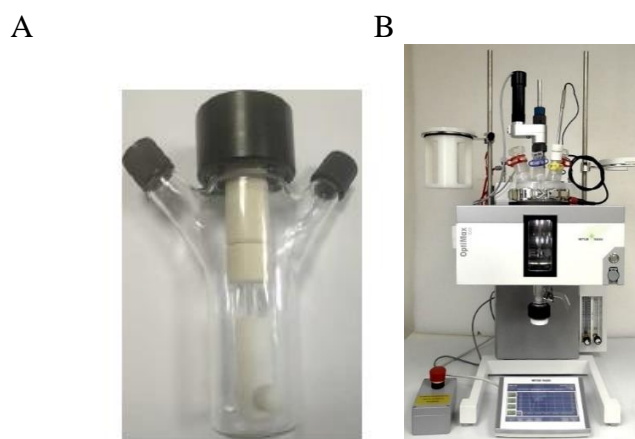


Figure 2.4 : A. Réacteur Wheaton® B. Réacteur Optimax®

### 2.3.3.2 Hydrolyse enzymatique

Les réactions d'hydrolyses de N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine et de N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine ont été effectuées dans le but d'évaluer l'activité des aminoacylases de *S. ambofaciens* et des extraits protéiques, lors de l'expression hétérologue des différentes acylases ainsi que celle des aminoacylases après immobilisation. L'hydrolyse est réalisée à 37°C dans des tubes à vis contenant le tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8 et 4 mM de substrat. La lysine produite lors de cette réaction est vérifiée par chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

## 2.4 Méthodes analytiques

### 2.4.1 Réactifs et solvants

Les produits chimiques utilisés dans cette étude sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2-5: Liste des produits utilisés pour les analyses des produits des réactions enzymatiques

	Produit	Fournisseur
Dosage acides aminés	Sodium Borate	Sigma
	$\beta$ -mercaptopropionic acid	Fluka
	Ortho-phthalaldehyde	Sigma
	4-Chloro-7-nitrobenzofurazan	Fluka
	Sodium phosphate mono basic déshydrate	Fluka
	Di-sodium hydrogenphosphate	Fluka
	Acetonitrile	Carlo-Erba
Dosage acides gras et produits acylés	Methanol	Carlo-Erba
	Acide trifluoroacétique	Sigma-aldrich
	N-10-undecylenoyl-L-Phénylalanine	SEPPIC
	N-capryloyl-L-glycine	SEPPIC
	Standard lysine acylés	Gencust
Chromatographie sur couche mince	Butanol	Sigma-aldrich
	Acide acétique	Carlo-Erba
	Cyclohexane	Carlo-Erba
	Acétate d'éthyle	Carlo-Erba
	Ninhydrine	Sigma-aldrich
	Permanganate de potassium	-
	Iode	-
Dosage de l'acétate de géranol	Géranol	Sigma-aldrich
	Acide acétique	Sigma-aldrich
	Acétate de géranol	Sigma-aldrich
	Méthyle décanoate	Sigma-aldrich

#### 2.4.2 Chromatographie sur couche mince (CCM ; analyse qualitative)

Les prélèvements des réactions d'hydrolyse et de synthèse en présence de lysine et/ou d'un acide gras, contenant des doubles liaisons, ont été analysés par CCM. La migration est réalisée sur des plaques de silice de 20 x 20 cm (Silica gel 60, Merck). Un volume de 5 à 10  $\mu$ L de prélèvement est déposé à 2 cm de la marge de la plaque avant de la placer dans une enceinte fermée hermétiquement contenant l'éluant. Les plaques sont ensuite séchées à l'air libre. Plusieurs types d'éluant ont été utilisés. Pour les réactions en présence de lysine, un mélange contenant du butanol (60 %), de l'acide acétique (20 %) et de l'eau (20 %) a été utilisé permettant de séparer la lysine de ces dérivés monoacylés (Soo et al., 2003a). Dans ce cas, la révélation est réalisée par pulvérisation d'une solution éthanolique de ninhydrine à 0,1 % qui va réagir avec les fonctions amines libres de l'acide aminé. La plaque est chauffée à 110 °C permettant l'apparition d'un chromophore violet (révélation destructive). Lors de la purification de l'undécényl-phénylalanine (C11'F) du mélange réactionnel contenant de l'acide 10-

undécénoïque, un mélange cyclohexane / acétate d'éthyle à 50 / 50 a été utilisé pour faire migrer l'acide gras. Une deuxième migration a été réalisée sur la même plaque après séchage à l'air libre en ajoutant 1% d'acide acétique au mélange permettant de faire migrer le C11'F. La plaque est ensuite séchée et exposée à des vapeurs saturées en iode qui va réagir et colorer les molécules présentant des doubles liaisons (révélation non-destructive).

### 2.4.3 Dosage de la lysine issue des réactions d'hydrolyse

La quantification de la lysine produite lors des réactions d'hydrolyse a été déterminée par deux méthodes dont l'une par l'utilisation d'une chromatographie liquide haute performance (HPLC) équipé d'un détecteur spectro-fluorimétrique (HPLC-Fluo), la deuxième méthode par l'utilisation d'une HPLC couplée à un spectromètre de masse (LC-SM).

La première méthode, utilisée permettant la séparation et la quantification de la lysine a été créée et brevetée par Shimadzu®. L'appareil HPLC (LC-20) Shimadzu® utilisé est représenté sur la figure 2.5 est équipé d'un détecteur fluorimétrique. Cette méthode est basée sur la détection des acides aminés fluorimétrie après une étape de dérivatisation des acides aminés par de l'ortho-phtaldéhyde (OPA). Celle-ci permet de détecter une fluorescence à 460 nm suite à une excitation à 350 nm. La dérivatisation consiste à la formation du dérivé thioisindoles fluorescents en présence de l'OPA et du  $\beta$ -mercaptoéthanol (figure 2.6). Pour cela, un volume de 10 $\mu$ L d'échantillon ou de standard est déposé dans un flacon HPLC de 1,5 mL puis le passeur automatique se charge de la réalisation du mélange de réactifs (tableau 2.6) avec l'échantillon et des temps d'attente avant injection suivant un programme prédéfini avec le logiciel (LC-solution®) de la chaîne HPLC.

Tableau 2-6 : Composition des réactifs utilisés pour la dérivatisation

Réactif	Composition	Quantité
Tampon Sodium Borate (pH à 9 ajusté avec NaOH 30%)	Acide borique	1,55 g
	Eau miliQ	250 mL
A	$\beta$ -mercaptopropionic	100 $\mu$ L
	Tampon borate	100 ml
B	OPA	200 mg
	Acétonitrile	30 mL
	Tampon borate	100 mL
C	4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl)	1g
	Acétonitrile	100 mL

1 ou 2  $\mu$ L de l'échantillon sont ensuite injectés dans le système. La séparation est réalisée par une colonne C18 (150 x 4,6 ; 5  $\mu$ m Alltech-Grace®, États-Unis), thermostatée à 45°C, à un débit de 1 mL/mn. L'éluion se fait par un gradient de phases suivie d'un nettoyage du système

## Chapitre II : Matériel et méthodes

avec de l'acétonitrile puis un retour dans les conditions initiales. La composition des solvants d'élution et le gradient utilisé sont représentés dans le tableau 2.7. L'activité spécifique (A.S) des enzymes a été déterminé suivant la formule :  $A.S \text{ (nmole de lysine produite / min / mg de protéines)} = d [\text{lysines produites}] / (dt * [\text{protéines de l'extrait soluble}])$ .

Tableau 2-7 : Gradient de phases et composition des solvants d'élution

Temps (mn)	Phase A (0,78 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1,79 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Phase B (600 mL phase A + 300 mL Acétonitrile)	Phase C (Acétonitrile / eau 80/ 20)
0 - 1	95%	5%	0%
1 - 10	5%	95%	0%
10 - 15	0%	100%	0%
15 - 16	100%	0%	0%
16 - 21	0%	0%	100%
21 - 34	95%	5%	0%

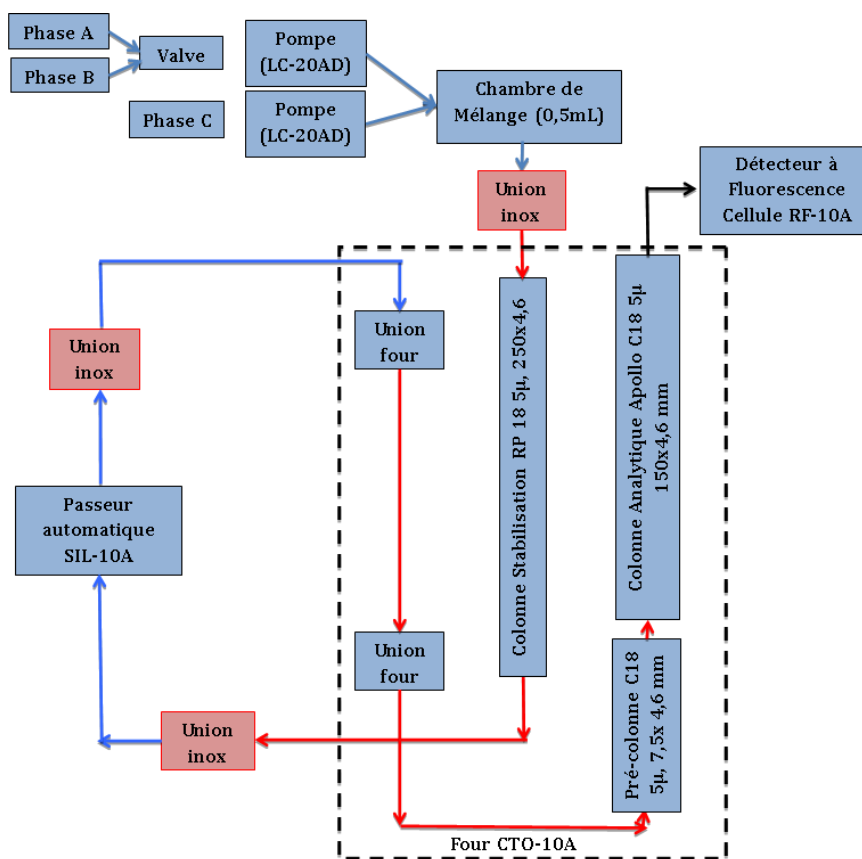


Figure 2.5 : Schéma de la chaîne CLHP et des équipements utilisés pour le dosage des acides aminés

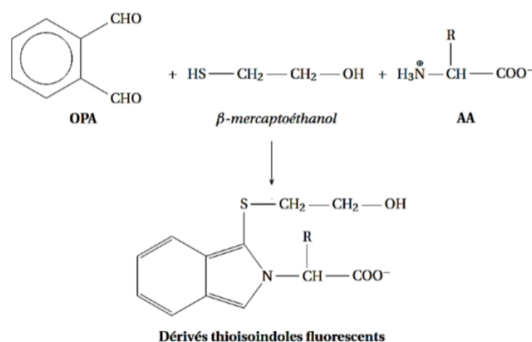


Figure 2.6 : Réaction de dérivatisation des acides aminés

La deuxième méthode, utilisée pour la détermination de la concentration de lysine produite au cours des réactions d'hydrolyse, ne nécessite pas d'étape de dérivatisation. Elle consiste à l'utilisation d'une colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 $\mu$ m), thermostatée à 10°C (Igloo-Cil®). Cette colonne contient une phase stationnaire en carbone graphitique poreux (phase très hydrophobe). La phase A utilisée contient 20 mM d'acide Nonafluoropentanoïque (NFPA ; acides carboxyliques perfluorés) préparé dans de l'eau déionisée permettant de mieux visualiser les acides aminés et une phase B composée d'acétonitrile. Le gradient utilisé est représenté sur le tableau 2.8. La détection et la quantification de la lysine se fait sur la base du suivi de la transition de la lysine (M+H/z=147.10uma) vers un ion fils majoritaire (M+H/z=84.10uma), issu de la dissociation induite après collision avec de l'argon, en mode MRM positif (Multiple Reaction Monitoring, aussi appelé Selective Reaction Monitoring – SRM), par LC-TQMS Shimadzu® selon les conditions présentées sur le tableau 2.9. L'appareil est équipé d'un système d'interface double ionisation ou DUIS (Dual Interface Ionization System) dont une ionisation par électro-nébuliseur ou ESI (ElectroSpray Ionization) et une ionisation chimique à pression atmosphérique ou APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization).

Tableau 2-8 : Gradient des solvants utilisés

Temps (mn)	Phase A	Phase B
0 - 1	100%	0%
1 - 11	85%	15%
11 - 21	74%	26%
21 - 31	50%	50%
31 - 41	50%	50%
41 - 42	100%	0%
42 – 52	100%	0%



Tableau 2-9 : conditions d'analyse des acides aminés avec la LC-MS

Paramètre	Réglage
Débit de gaz de nébulisation	2 L/mn
Débit de gaz de chauffage	10 L/mn
Débit de gaz de séchage	10 L/mn
Température Interface	300°C
Température de la ligne de désolvatation	250°C
Température de la chambre de nébulisation	400°C
Temps de mesure par spectre (Temps de pause)	3 ms (1 ms)
Tension Interface	5kV
Tension aiguille Corona	4.5kV
Tension Q1	-15V
Tension Q3 Pre Bias	-17V
Energie de collision	18 unités
CID gaz	250kPa

#### 2.4.4 Dosage des acides aminés acylés produits et des acides gras consommés lors des réactions de N-acylation

La quantification des produits issus de la réaction d'acylation des acides aminés et de la consommation des acides gras a été réalisée par CLHP équipé d'un détecteur UV-visible et d'un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL). La chaîne CLHP utilisée est une Shimadzu LC 10 AD-VP (Shimadzu®, France) équipée d'une colonne Alltima HP C18 « amide » (125 x 2,1 mm, 5µm, Alltech Grace®) avec sa pré-colonne (15 x 2,1 mm, 5µm, Alltech Grace®), maintenue à 25°C dans un four colonne (CTO-10 AS VP ; Shimadzu®), et d'un injecteur automatique d'échantillons (SIL-10 AD VP ; Shimadzu®), d'un détecteur UV à barrette de diode (SPD-M10A VP 190 – 290 nm ; Shimadzu®) et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière à faible température (ELSD – LT ; Shimadzu®). Lors de l'analyse des produits de la réaction de N-acylation de la phénylalanine, leucine et isoleucine une colonne Force Biphenyl (150x2.1mm ; 3µm) nouvellement mise sur le marché par Restek® (USA), maintenue à 35°C, a été utilisée à cause de soucis de séparation du produit et de l'acide gras. La présence de cycles phényle à la surface de la phase stationnaire permet une meilleure résolution en présence d'acides aminés hydrophobes. Le débit (0,2 mL/mn) et le gradient des solvants d'élution (tableau 2.10) sont les mêmes pour les deux colonnes.

Tableau 2-10 : Composition et gradient des solvants d'élution pour les colonnes C18 amide et Biphényl

Temps (mn)	Phase A (méthanol/eau/acide trifluoroacétique (TFA), 60/40/0,1)	Phase B (méthanol/TFA, 100/0,07)
0 - 1	95%	5%
1 - 7	5%	95%
7 - 20	5%	95%
20 - 21	95%	5%
21 - 35	95%	5%

La détection et la quantification ont été réalisées par spectrométrie UV à 214 nm pour les réactions en présence de molécules à courte chaîne et pour les acides gras non visibles en DEDL (taille inférieure à 12 carbones). Le détecteur DEDL réglé à une pression d'air comprimé de 350 kPa et une température de 40°C a été utilisé pour la quantification des produits acylés tels que l'undécényl-phenylalanine. Les concentrations des produits ou des acides gras ont été déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage des standards. Le pourcentage de conversion correspond au rapport entre le nombre de moles du produit formé ou de l'acide gras consommé lors de la réaction et le nombre de moles d'acide gras initial.

#### 2.4.5 Identification de la régiosélectivité et de la chimio-sélectivité des enzymes par CL-SM-SM

L'analyse qualitative et semi-quantitative des acides aminés N-acylés a été réalisée par CLHP-SM-SM (ThermoFisher Scientific®, San Jose, CA, USA) équipée d'un détecteur UV (PDA) et d'un spectromètre de masse à trappe ionique linéaire (LTQ). La séparation est réalisée par une colonne C18 Altima (Alltech Grace®, Darmstadt, Germany, 150mm × 2.1mm, 5 µm) réglée à 25°C sauf dans le cas des dérivés de la phénylalanine, la leucine ou l'isoleucine où la colonne Allure Biphenyl (150 x 2.1mm ; 3µm, Restek®, USA) réglée à 35°C, est utilisée. Un volume de 10 µL de l'échantillon est injecté sur la colonne et l'élution est réalisée par gradient, présenté sur le tableau 2.11, de méthanol à un débit de 0,2 mL/min. L'ionisation de l'échantillon est réalisée par électro-spray en mode positif (ESI+). Les conditions d'analyse en spectrométrie de masse sont : la tension d'électro-spray = +4.5kV ; le gaz de nébulisation, le gaz auxiliaire et le gaz rideau = 30, 10 et 10 UA/min, respectivement ; température capillaire = 250°C ; tension capillaire = 48V ; tensions optiques de transfert, tube lens, split lens et front lens = 120V, -34V et -4.25V, respectivement. La calibration des paramètres de l'optique ionique pour le mode ESI+ a été réalisée en utilisant une solution de 0,1 g/L d'oleoyl-lysine-serine injectée à un débit de 5 µL/mn. Le balayage entier des spectres de masse a été effectué entre 100 et 1000 m/z pour les spectres MS et MS<sup>2</sup>. La chimio- et la régiosélectivité des enzymes et déduite en se basant

sur la masse et la structure du produit attendu. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel Xcalibur®.

Tableau 2-11 : Composition et gradient des solvants d'élution des analyses en CL-SM-SM

Temps (mn)	Phase A (méthanol/eau/TFA, 80/20/0,1 acide laurique et oléique méthanol/eau, 50/50 acides gras plus courts (inférieur à C12))	Phase B (méthanol/TFA, 100/0,1)
0 – 1	100%	0%
1 – 6	0%	100%
6 – 16	0%	100%

#### 2.4.6 Dosage de l'acétate de géraniol issu des réactions de O-acylation sous scCO<sub>2</sub>

La quantification de l'acétate de géraniol issu de la réaction d'acylation du géraniol par l'acide acétique a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CG) (Agilent®, Santa Clara, USA) et détecteur à ionisation par flamme (FID), chauffé à 250°C, et couplée à un spectromètre de masse à triple-quadripôle (Agilent®). Lors des analyses, un volume de 1 µL de mélange réactionnel, contenant du méthyle décanoate comme étalon interne, est injecté avec un injecteur automatique (Agilent®) avec un rapport de division de 100:1 et une température d'injection de 240°C. Le chromatographe est équipé d'une colonne HP-INNOWax (30 m×0,32 mm DI × 0.25 µm, Agilent®) installée dans un four à colonne chauffé à 60°C pendant 2 mn. Durant l'analyse, la température est augmentée à 200°C avec un gradient de 10°C / mn puis de 200°C à 220°C avec un gradient de 5°C / mn. Le gaz vecteur est composé d'hélium à un débit de 1,5 mL/mn. La quantification est obtenue à partir des gammes étalons de l'acide acétique, du géraniol et de l'acétate de géraniol.

#### 2.4.7 Dosages des protéines

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de la concentration des protéines issues de la production d'enzymes ou lors de la détermination de la quantité de protéines immobilisées sur les supports. L'activité spécifique des enzymes pour les réactions d'hydrolyse de l'α-, ε-acétyl-lysine ou pour les réactions d'acylation a été calculée selon la formule

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Quantité de produit (mmol / h)}}{\text{Quantité de protéine (mg)}}$$

##### 2.4.7.1 Bradford

La détermination de la concentration des protéines des échantillons a été réalisée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Elle est basée sur le dosage colorimétrique de l'interaction entre

le bleu de Coomassie G-250 et les résidus arginine et hydrophobes des protéines. Le réactif de Bradford est une solution contenant 20 mg de bleu de Coomassie G-250 dissout dans 10 mL d'éthanol à laquelle est ajouté 20 mL d'acide orthophosphorique et 20 mL d'eau. 20  $\mu$ L de l'échantillon ou du standard est mélangé à 980  $\mu$ L du réactif de Bradford puis laissé réagir pendant 15 min à l'obscurité. L'absorbance à 595 nm est ensuite mesurée et la concentration en protéines est déterminée à partir d'une courbe de calibration d'une solution étalon (de 0,25 à 1,5 g/L) d'albumine de sérum bovin (BSA).

### 2.4.7.2 BCA

La méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay) a aussi été utilisée pour la quantification des protéines. C'est un dosage colorimétrique basé sur la formation d'un complexe entre le  $\text{Cu}^{2+}$  et les protéines sous des conditions alcalines, suivi par la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ . Le taux de réduction est proportionnel à la quantité de protéines présentes. Il a été démontré que la cystéine, tryptophane et la tyrosine et les liaisons peptidiques peuvent réduire le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ . La présence de l'acide bicinchoninique permet l'apparition d'une couleur pourpre, absorbant à 562 nm, lors de la formation du complexe avec le  $\text{Cu}^+$ . Le réactif BCA est un mélange de deux réactifs A et B. Il est préparé en mélangeant 50 unités du réactif A, un mélange d'acide bicinchoninique, de carbonate de sodium, de tartrate de sodium et de bicarbonate de sodium dans NaOH 0,1 N, avec 1 unité du réactif B, une solution de sulfate penta-hydrate de cuivre (II) 4 % (W/V). Un volume de 100  $\mu$ L de l'échantillon est mélangé avec 2 ml du mélange de réactif BCA suivi d'une incubation de 30 mn à 37°C. L'absorbance à 562 nm est mesurée et la concentration de protéines déterminée à l'aide d'une gamme d'étalonnage réalisée avec du BSA.

### Étude théorique : modélisation moléculaire

Suite aux réactions de N-acylation des acides aminés par CALB dans différents milieux réactionnels, une étude des interactions entre CALB et les accepteurs d'acyle (acides aminés) en présence de différents acides gras (donneurs d'acyle) a été effectuée à l'échelle moléculaire. Cette modélisation moléculaire a été réalisée en utilisant le logiciel Discovery Studio® 4.1 (Accelrys®, Inc) installé sur un ordinateur bi-processeur Intel Xeon® 4CPU L5420 (2,5 Ghz, 30 cœurs de calculs, 16 Go de mémoire). Deux études des interactions enzyme/substrat ont été réalisées par modélisation moléculaire. La première est l'étude de la N-acylation de la phénylalanine (Ligand) catalysée par CALB dans laquelle un acide oléique a été introduit par liaison covalente entre le groupement hydroxyle de l'acide gras et la sérine catalytique (Ser-105). La structure de l'acyl-enzyme utilisée a été construite et optimisée lors de l'étude de Ferrari et al., (2014). La deuxième étude a pour but d'évaluer les interactions moléculaires entre

15 acides aminés protéinogéniques et CALB sur laquelle un acide undécénoïque a été greffé. La construction et l'optimisation de la structure de ce dernier ainsi que la structure de tous les ligands ont été réalisées lors de cette étude. Le protocole de docking et d'analyse des possibles interactions ont été réalisés de la même manière pour les deux études.

### 2.5 Construction des structures

#### 2.5.1 Structure des ligands

La structure tridimensionnelle de différents acides aminés (ligands) a été construite en utilisant le module Builder de Discovery Studio® 4.1. Afin de réaliser le typage des atomes, des molécules construites, qui permet la bonne reconnaissance du système moléculaire par le logiciel, un champ de force CHARMM a été appliqué sur les structures. Une correction de la géométrie des structures, qui assure un bon ajustement des longueurs et des angles des liaisons, a été effectuée en utilisant l'outil « clean geometry » avant de réaliser une étape de minimisation des énergies des systèmes de 2000 itérations avec l'algorithme : Steepest Descent.

#### 2.5.2 Structure de CALB et de l'acyl-CALB

La structure de l'oléoyl-CALB, utilisé lors de la première étude, a été construite et optimisée à partir de la structure cristallisée 1LBS issue de la « protein data bank » (PDB) lors de la thèse de Ferrari, (2014). Cette structure cristallographique de CALB est formée de six chaînes protéiques, chacune d'entre elle est composée de 317 acides aminés. Lors de la cristallisation, un inhibiteur éthyl-hexylphosphonate, lié par liaison covalente à la sérine catalytique, a été cristallisé. Sachant que la triade catalytique de CALB est formée des résidus Ser105, His224 et Asp187, la présence de l'inhibiteur a permis d'avoir des informations sur le positionnement du ligand par rapport aux autres résidus et au trou oxyanionique (Thr40 et Gln106). Cela a permis d'orienter la construction de l'oléoyl-CALB, après suppression de l'inhibiteur, suite à l'ajustement de la structure de l'acide oléique et de l'état de protonation des résidus de CALB à un pH neutre. Une boîte d'eau, de type TIP3P, comportant 16585 molécules d'eau et une dimension géométrique de  $a = 92 \text{ \AA}$ ,  $b = 86 \text{ \AA}$ ,  $c = 70 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  ainsi qu'un contre-ion, a été ajoutée, afin de solvater et de neutraliser le système, avant de procéder aux étapes de dynamique moléculaire permettant d'évaluer la stabilité du système. La configuration d'acyl-CALB sélectionnée a été utilisée dans cette étude. Cette dernière a été modifiée afin de passer de 18 carbones, avec une double liaison au niveau du 9<sup>ème</sup> carbone, à 11 carbones avec une double liaison au niveau du 10<sup>ème</sup> carbone. Différentes étapes de minimisation de l'énergie du système et de dynamique moléculaire ont été réalisées afin d'évaluer la stabilité du système et d'étudier le positionnement de la chaîne de l'acide gras dans la cavité catalytique de CALB

et permettant de sélectionner la conformation la plus appropriée pour l'étape de docking moléculaire.

### 2.5.2.1 Minimisation de l'énergie du système

Les étapes de minimisation ont été réalisées en utilisant les algorithmes « Steepest descent » (lors de la première étape) ou « Conjugate gradient » en fixant un nombre d'étapes maximales à 10000 et en augmentant l'exigence par rapport au gradient de l'écart quadratique moyen (rmsd : root mean square deviation gradient). En effet, ce dernier a été réduit d'un facteur 10 à chaque étape de la minimisation tout en procédant à une relaxation progressive de la structure de l'acyl-enzyme. Le rmsd est le critère qui doit être respecté si on ne veut pas relancer le calcul avec un nombre d'étape plus important (tableau 2.12).

Tableau 2-12 : Conditions implémentées lors des étapes de minimisation de l'énergie du système

Conditionnement de la structure	Algorithme	Critères d'arrêt du calcul
Fixation de toute la structure par des contraintes : tous les atomes sont fixes sauf les atomes d'H et l'eau de la cristallographie	Steepest descent	Max steps 10000 et/ou rmsd gradient 0,1
Fixation de la chaîne principale et contraintes harmonieuses appliquées aux chaînes latérales des résidus	Conjugate gradient	Max steps 10000 et/ou rmsd gradient 0,01
Fixation de la chaîne principale par des contraintes harmonieuses	Conjugate gradient	Max steps 100000 et/ou rmsd gradient 0,001
Relaxation de tout le système	Conjugate gradient	Max steps 100000 et/ou rmsd gradient 0,0001

### 2.5.2.2 Simulations de dynamique moléculaire

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées par le module dynamique NAMD du logiciel Discovery Studio® 3.5 en partant de la structure issue des étapes de minimisation. Les conditions, appliquées lors de la simulation, sont présentées sur le tableau 2.13. Cette étape a été réalisée selon celle décrite par Ferrari (2014).

La dynamique moléculaire commence par l'équilibration du système intégrant des équations de mouvement. Cette phase permet au système initial d'atteindre la configuration d'équilibre (stabilité de l'énergie, de température et de pression du système) à une température donnée (300 K). La deuxième étape, la plus longue (environ 6 heures), est la phase de production de trajectoires. Elle permet de générer les différentes trajectoires possibles du système et ainsi donner plusieurs configurations d'acyl-enzymes.

Tableau 2-13: Conditions implémentées lors des étapes de dynamique moléculaire

Paramètre	Valeur
Température	300 K
Pas d'intégration	2 fs
Algorithme SHAKE (maintient rigide du lien entre les atomes lourds et les atomes d'hydrogène)	Oui
Ensembles thermodynamiques	NPT : ensemble isothermale-isobare
Distance de troncation (Particule Mesh Ewald)	Cutoff : 12 Å Switching : oui, distance (interactions de Van der Waals) : 10 Å
Conditions périodiques frontières (Periodic Boundary Conditions)	Oui
Sauvegarde des coordonnées	2 ps
Actualisation de la liste des atomes pour les interactions	Toutes les 20 étapes d'intégration
Temps de simulation	1000 ps
Nombre de processeur	32

### 2.5.2.2.1 Analyses des résultats

Les trajectoires de dynamique moléculaire, issues de la dernière étape, permettent de visualiser l'évolution de la conformation de l'enzyme au cours du temps. Cela permet de tracer et de visualiser l'évolution des paramètres thermodynamiques du système (énergie, température, ...). L'analyse des conformations générées permet d'évaluer la stabilité de la protéine en calculant l'écart quadratique moyen (RMSD ; Root Mean Square Deviation) et donne une idée de l'éloignement de la structure finale de la structure cristallographique. Il est calculé selon l'équation :

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=0}^N \delta i^2} \quad \text{où } N \text{ est le nombre d'atomes et } \delta, \text{ la distance entre } N \text{ paire d'atomes}$$

Le positionnement de la chaîne undécénoyle, et l'orientation de son groupement carbonyle dans la cavité du site actif par rapport à la triade catalytique et aux résidus du trou oxyanionique ont été évalués dans le but vérifier la stabilité de la structure et de sélectionner la configuration la plus appropriée pour l'étape de docking moléculaire. Le choix de la conformation a été établie sur la base de critères de distance. Les critères sont une distance inférieure à 3 Å entre l'oxygène du groupement carbonyle de l'acide gras, fixé sur la sérine catalytique, et les fonctions amides et hydroxyles de la Thr40 et de la Gln106. La deuxième condition est le bon positionnement de la chaîne grasse permettant une bonne accessibilité de l'acide aminé au fond de la cavité catalytique.

### 2.5.2.2.2 Définition du site actif

Afin d'identifier la zone d'interaction du ligand, il a été nécessaire de définir le site actif de l'enzyme. Réalisé en utilisant la méthode des cavités, elle identifie celles (zone vide au niveau de la structure) à la surface de l'enzyme comme de possibles sites de liaison par la création d'une grille tridimensionnelle (x, y, z) avec un espacement de 0,5 Å qui évalue les zones libres à la surface. Cela permet la récupération de plusieurs sites d'interaction possibles. La cavité choisie sera celle qui recouvre les résidus de la cavité catalytique déjà identifiés et largement décrits dans la littérature (Uppenberg et al., 1994b). Elle est formée principalement de résidus aliphatiques hydrophobes (Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Ser150, Ala151, Val154, Ile189, Lys290, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 et Ala286), de certains résidus hydrophiles (Asp134 et Gln157) et des résidus du trou oxyanionique (Thr40 et Gln106). C'est une cavité étroite et profonde au fond de laquelle se trouve la triade catalytique (Ser105, His224 et Asp187).

### 2.5.2.3 Simulation de docking

Le docking moléculaire est une méthode qui permet d'évaluer les possibilités de positionnement du ligand, selon différentes orientations, au niveau du site actif de CALB en explorant l'espace conformationnel. L'algorithme utilisé dans cette étude, implémentée dans le module LibDock de Discovery Studio, est un algorithme de docking rigide où le ligand est considéré comme un élément flexible et l'enzyme comme un élément rigide. La flexibilité de la protéine lors des réactions n'est donc pas prise en compte.

Le protocole de docking de LibDock est basé sur l'algorithme développé par Diller, Merz, (2001). Il se déroule en plusieurs étapes comprenant la génération des conformations du ligand, l'identification des points d'ancrage (hotspots), l'évaluation des interactions possibles entre ces derniers et le ligand (docking), l'optimisation des complexes (poses) générés et enfin leurs classements selon la probabilité d'apparition (scoring) (Rao et al., 2007). La première étape consiste à l'identification du site actif par l'échantillonnage de l'espace conformationnel du ligand selon la méthode Monte Carlo (méthode stochastique). La génération des conformères du ligand est réalisée en modifiant l'angle de torsion de la molécule initiale de façon aléatoire. Les différents conformères ainsi produits sont introduits au niveau du site actif selon quatre orientations permettant quatre positionnements différents du ligand (Figure 2.7). Le docking est réalisé suite à l'identification et le classement des points polaires et apolaires présents au niveau du site actif de l'enzyme. Cela permet de cartographier les hotspots (point chauds) qui seront utilisés pour évaluer, respectivement, les interactions hydrophiles et hydrophobes avec les atomes polaires, atomes d'hydrogène de l'accepteur d'acyle (interactions hydrogènes), ou



les atomes apolaires, atomes de carbone (i.e. cycles aromatiques et chaînes aliphatiques). L'étape d'optimisation consiste à retirer les poses qui ne sont pas favorables stériquement (problème d'accessibilité) en utilisant l'algorithme d'optimisation BFGS qui permet l'évaluation du potentiel stérique et des interactions hydrogènes. Les poses ainsi générées sont classées (scoring) en utilisant des fonctions de score calculées sur la base d'un consensus associant plusieurs fonctions de score afin d'améliorer la fiabilité du classement. Six différentes fonctions de scores ont été utilisées : PLP1 et PLP2 (Gehlhaar et al., 1995), LigScore1 et 2 (Krammer et al., 2005), Jain (Jain, 1996) et PMF (Muegge, Martin, 1999). Enfin, les poses sont classées selon le nombre d'apparition de cette pose lors des différents classements par les six fonctions de score appliquées. Par exemple, si une pose est identifiée plusieurs fois par les différentes fonctions de score parmi le top 10, cela signifie que la probabilité d'apparition de cette conformation est élevée.

Suite au docking moléculaire, le choix des poses produites est réalisé sur la base du respect de certains critères de distance en plus du classement de ces poses. Une pose productive est définie comme une pose permettant la formation du 2ème intermédiaire tétraédrique conduisant à l'acylation de l'accepteur d'acyle. Les critères de distance permettant l'attaque nucléophile et l'acylation du groupement amine, de l'acide aminé, par le groupement hydroxyle de l'acide gras sont :

- Une distance inférieure à 4 Å entre groupement nucléophile de l'accepteur d'acyle (amine) et la fonction carbonyle de l'acyl-enzyme
- une distance inférieure à 4 Å entre l'His224, qui intervient dans l'attaque nucléophile par transfert d'un proton, et le groupement amine de l'accepteur d'acyle
- une distance inférieure à 4 Å entre l'amine secondaire de l'His224 et la chaîne latérale de la Ser105 permettant de vérifier le maintien de la conformation du site actif.

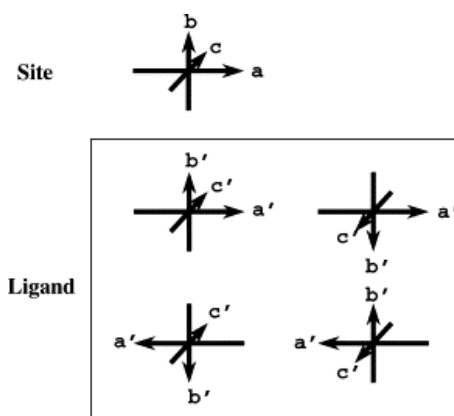


Figure 2.7 : Représentation des orientations du ligand au niveau du site actif (Venkatachalam et al., 2003)



## CHAPITRE III : PERFORMANCES DES LIPASES POUR LA RÉACTION D'ACYLATION ENZYMATIQUE DES ACIDES AMINÉS

---



### 3 Chapitre III : Performances des lipases pour la réaction d'acylation enzymatique des acides aminés

#### 3.1 Introduction :

Le développement de procédés enzymatiques d'acylation d'acides aminés présente plusieurs enjeux majeurs environnementaux et économiques. En effet, la réaction chimique actuellement utilisée à l'échelle industrielle présente un impact environnemental important, remettant en question l'adéquation de cette méthode de production. Cela a conduit à l'émergence de projets de développement de procédés éco-compatibles durables afin d'atténuer les effets négatifs de cette voie de synthèse. L'objectif global de cette thèse est de contribuer à la mise en place d'un procédé d'acylation enzymatique d'acides aminés par des acides gras, dans des conditions réactionnelles plus respectueuses de l'environnement. Afin de respecter les règles de la chimie verte, il est crucial de choisir au mieux la combinaison « enzyme/solvant réactionnel/conditions réactionnelles » la plus adaptée pour réaliser la réaction de synthèse du produit souhaité, sans production de molécules secondaires, tout en réduisant les étapes de préparation du produit fini (Sheldon, 2012 ; Sheldon, Woodley, 2018b). Lors de cette étude, l'aptitude d'enzymes spécifiques à catalyser la réaction d'acylation des acides aminés en général, puis en se focalisant sur la réaction de production de certains surfactants à intérêt industriel (10-undécénoyl-phénylalanine, octanoyl-glycine, ...) a été évaluée. Ces molécules ont été décrites dans la littérature comme possédant des propriétés biologiques très attractives pour des applications en cosmétique (agent dépigmentant de peau, agent anti-âge, agent antibactérien,...) (Bissett et al., 2009a ; Sreenu et al., 2015 ; Pinazo et al., 2016 ; Mangodt et al., 2019). Certaines études ont décrit la capacité d'enzymes telles que les lipases (Montet et al., 1990 ; Valivety et al., 1997), les protéases (Bernal, Guzman, et al., 2018b) et les acylases (Koreishi et al., 2005a ; Dettori et al., 2017 ; Takakura, Asano, 2019) à catalyser la réaction de N-acylation des acides aminés. Par ailleurs, chaque catégorie d'enzymes présente des spécificités de substrat avec des chimio-, régio- et énantio-sélectivités très différentes. Dans notre cas, la N-acylation des acides aminés sur l'amine en position alpha est la réaction la plus recherchée. Peu d'études ont décrit l'aptitude d'enzymes à réaliser ce type de réaction (Koreishi et al., 2006a ; 2005a ; Takakura, Asano, 2019).

La première stratégie suivie dans notre étude a concerné l'utilisation des hydrolases telles que les lipases, en particulier la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) en milieu non conventionnel. Cette dernière a été largement étudiée autant pour ses performances hydrolytiques d'esters d'acides gras ainsi que pour sa chimio-, régio- et énantio-sélectivité lors

des réactions de synthèse : estérification, amidation, aminolyse, résolution de mélange racémique... (Krishna, Karanth, 2002 ; Husson et al., 2008b ; Durand et al., 2013a ; Neta et al., 2015 ; Gérard et al., 2017a). En effet, ces enzymes ont été décrites dans la littérature comme capables de réaliser des réactions d'acylation de molécules fonctionnelles telles que les sucres, les flavonoïdes, les amino-alcools et les acides aminés, à intérêt cosmétique, dans des milieux réactionnels anhydres tels que les solvants organiques, les liquides ioniques et le CO<sub>2</sub> supercritique (Khan, Rathod, 2015 ; Miguez et al., 2018 ; Tripathy et al., 2018). Ces enzymes ont été largement utilisées pour catalyser les réactions de O-acylation tandis que leur mise en œuvre dans les réactions de N-acylation des molécules, en particulier celles des acides aminés, ont été très peu décrites. Très peu d'informations sur la N-acylation des acides aminés, autres que la lysine et les esters de certains acides aminés tels que la glycine, sont disponibles dans la littérature (Montet et al., 1990 ; Izumi et al., 1997 ; Valivety et al., 1997 ; 1998 ; Soo et al., 2004b ; Bidin et al., 2009 ; Bernal, Guzman, et al., 2018b).

Le but de cette étude est d'évaluer la spécificité de substrat et la sélectivité de CALB pour la réaction d'acylation des acides aminés dans différents milieux réactionnels. Plusieurs études précédentes réalisées *in-silico* et *in-vitro* ont montré que CALB présente une régio-sélectivité orientée en majorité vers l'amine en position epsilon de la lysine mais aucune étude de sélectivité envers les autres acides aminés n'a été menée (Ferrari et al., 2014a ; L. Dettori, Jelsch, et al., 2018b). Afin de développer un procédé respectueux de l'environnement, les solvants réactionnels non aqueux les plus éco-compatibles (CO<sub>2</sub> supercritique, solvants eutectiques, ...) ont été testés en plus des solvants organiques. D'autre part, afin de consolider les résultats expérimentaux obtenus, une étude par modélisation moléculaire des interactions acyl-enzyme/acides aminés a été réalisée à la fin de cette partie.

### 3.2 Acylation enzymatique catalysée par les lipases en solvant organique

L'objectif de cette étude préliminaire est de vérifier la faisabilité de l'acylation enzymatique des acides aminés par CALB et déterminer la chimio- et régiosélectivité de l'enzyme en solvant organique. Pour cela, plusieurs réactions ont été mises en œuvre en utilisant l'acide undécénoïque (0,24 M) comme agent acylant en présence des 22 acides aminés protéinogènes (0,12 M). Le choix de l'acide undécénoïque comme donneur d'acyle a été motivé par son intérêt cosmétique en particulier pour l'obtention de l'undécénoyl-phénylalanine (Bissett et al., 2009a). La réaction a été réalisée dans du 2-méthyl-2-butanol à 55°C pendant 48h (Husson et al., 2010a). Afin que les substrats soient sous forme neutre, de la triéthylamine (TEA) a été ajoutée à hauteur de 2.4 M en concentration finale (Reyes-Duarte et al., 2002). Le mélange

réactionnel a été analysé par HPLC et par LC-MS-MS afin de détecter l'apparition de produits acylés et d'évaluer la sélectivité de la réaction. Sur les 22 acides aminés, la lysine a été acylée uniquement sur l'amine de sa chaîne latérale (figure 3.1). En effet, l'analyse par LC-MS-MS a montré l'apparition d'un seul produit monoacylé correspondant au rapport  $m/z$  de 313 (Figure 3.1 A). La fragmentation de ce dernier a généré un seul ion fils majoritaire correspondant à la libération du groupement carboxylique présent à l'extrémité de la molécule (Figure 3.1 B). Cela n'est pas le cas de l' $\alpha$ -10-undécényl-lysine (standards commercial) dont la libération du groupement carboxylique est moins prononcée, avec le  $[C_{11}K - 2 H_2O + H]^+$  comme ion fils majoritaire (figure 3.1 C). Cela confirme l'acylation sur l'amine en position epsilon de la lysine. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui avaient mis en évidence la régiosélectivité de CALB orientée vers l'amine en position epsilon de la lysine. Montet et al. 1990 avaient réalisé des réactions avec des acides gras issus de l'hydrolyse de triglycérides et la lysine en présence de CALB. A l'issue de cette réaction, il a été montré que la lysine est acylée avec plusieurs acides gras (acides laurique et oléique) exclusivement sur la fonction amine de la chaîne latérale (position epsilon). Les produits issus de cette réaction présentent une solubilité très faible dans l'eau, ce qui leur confère un intérêt en cosmétique en tant qu'agents de surface résistant à l'eau (Montet et al., 1990). D'autres auteurs se sont intéressés à l'étude *in-silico* des interactions acyle-enzyme/substrat avec des peptides ou acides aminés (Ferrari et al., 2014a ; L. Dettori, Jelsch, et al., 2018b). Dettori et al., 2018 ont réalisé une étude approfondie *in-silico* par docking flexible sur les interactions entre l'oleoyl-CALB et la lysine. Les résultats de simulation par docking ont d'abord montré deux orientations possibles de la lysine dans la cavité catalytique, selon que la fonction amine  $NH_2 \alpha$  (N terminal) ou la fonction amine  $NH_2 \epsilon$  (chaîne latérale) pointe vers les résidus catalytiques. Les deux familles de complexes obtenues ont été analysées selon des critères de distance entre la fonction amine dirigée vers la triade catalytique et, d'une part (i) le groupement carbonyle de l'acyle enzyme formé par fixation de l'acide gras sur la sérine catalytique 105, d'autre part (ii) l'azote de l'histidine catalytique 224. Ces mesures ont été complétées par des calculs d'énergie d'interaction électrostatique entre la lysine et les résidus de la triade catalytique, ainsi que 24 autres résidus de la cavité catalytique. Les résultats obtenus sur la base des critères de distance et d'énergie ont suggéré l'acylation quasi exclusive de la fonction amine  $\epsilon$  de la lysine. Par ailleurs, en observant de manière plus détaillée la cavité catalytique de l'enzyme CALB, Dettori et al. ont observé que les résidus Gln157 et Ser153 localisés à l'opposé de la triade catalytique interagissent avec la fonction amine dans le cas de l'orientation  $\alpha$ , ce qui pourrait expliquer le

manque d'interaction observé avec l'His224 de la triade catalytique, et par suite, l'absence quasi-totale de lysine N-acylée en position  $\alpha$ .

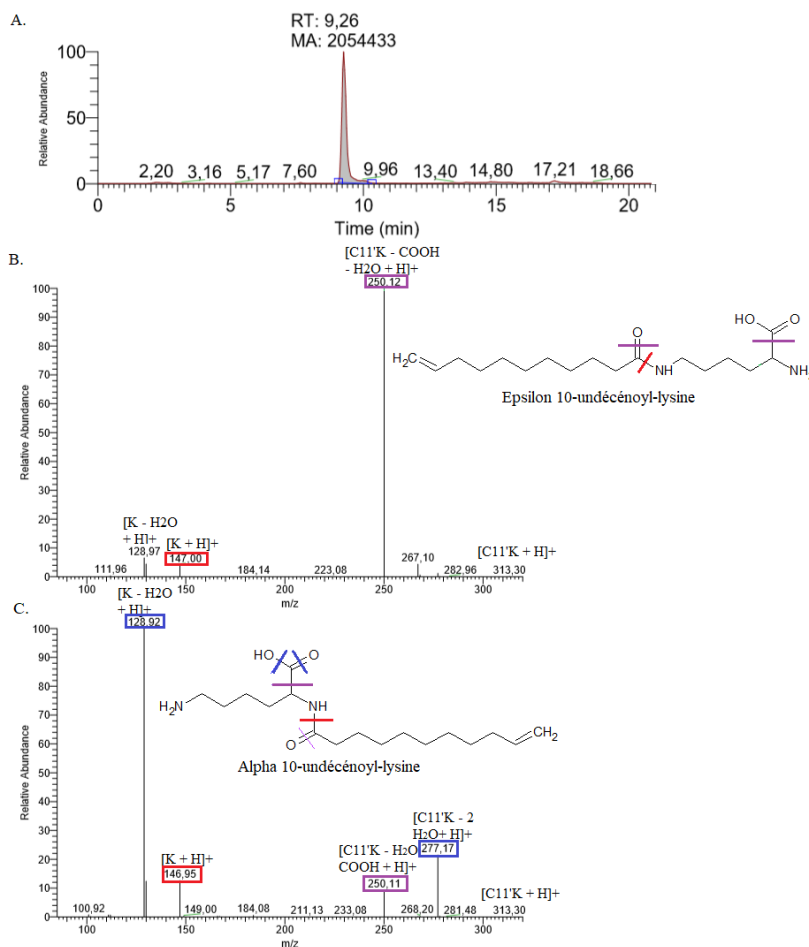


Figure 3.1 : analyse LC-MS-MS des produits de la réaction d'acylation de la lysine A. suivi MS de l'élution du produit monoacylé (313 m/z) au cours du temps B. fragmentation MS2 du produit issu de la réaction (temps de rétention 9,26 min) correspondant à l' $\epsilon$ -10-undécénoyl-lysine C. fragmentation MS<sup>2</sup> de l' $\alpha$ -undécénoyl-lysine à titre de comparaison.

Concernant l'acylation des autres acides aminés, les analyses en LC-MS-MS ont montré l'apparition de glycine acylée en très faible quantité ainsi que des traces de phénylalanine acylée. La N-acylation de la glycine a été confirmée en comparant le profil de fragmentation avec celui du produit de référence. La fragmentation du produit acylé montre l'apparition d'ions fils correspondant aux ions  $[MM_{\text{produit}} - O_2 + H]^+$  et  $[\text{produit} - COOH]$ , ce qui confirme l'acylation sur le groupement amine de la glycine (Figure 3.2). Certains auteurs se sont intéressés à l'acylation de la glycine avec de l'acide arachidonique en utilisant CALB comme catalyseur (Goujard et al., 2004). Ils ont montré que CALB est capable de catalyser la réaction d'acylation de la glycine avec de très faibles taux de conversion. Par ailleurs, la modification de la structure de l'accepteur d'acyle (glycine) par l'utilisation d'une forme ester a permis une



amélioration significative du taux de conversion passant de moins de 10 % avec la glycine à plus de 75% en utilisant l'ester de glycine et d'acide *tert*-butylique. Cette augmentation de rendement a été reliée à l'amélioration de la solubilité de l'acide aminé sous forme ester aliphatique (Goujard et al., 2004). D'autres auteurs expliquent cette amélioration par l'utilisation de molécules dites « activées » (ester de peptide, par exemple), permettant un meilleur contrôle de la cinétique de la réaction et l'orientation de la réaction de synthèse en faveur de l'acylation du groupement amine (Hanefeld, Lefferts, 2018).

Pour expliquer certains de ces résultats à l'échelle moléculaire, Dettori et al. (2017) ont mené des simulations de docking moléculaire en utilisant la glycine en présence de l'oléoyl-CALB comme structure modèle d'acyl-enzyme. Les résultats ont montré que la glycine, en raison de sa petite taille, avait du mal à se positionner et se stabiliser au sein de la cavité du site actif engendrant de très faibles interactions avec les résidus catalytiques. Des simulations menées avec des esters de glycine (glycine méthyl ester, glycine éthyle ester et glycine tert butyl ester) ont suggéré une meilleure stabilisation de la glycine dans la cavité ainsi qu'une amélioration de ses interactions avec les acides aminés constituant les parois de la cavité et les résidus du site actif. Des réactions d'acylation de la glycine et de ses différents dérivés par l'acide oléique comme donneur d'acyle ont permis de confirmer ces résultats. En effet, une augmentation du taux de conversion a été observée en présence d'ester de glycine, comparativement à la glycine. Plus précisément, les taux de conversion les plus élevés ont été observés avec les esters de glycine les plus encombrés, un taux de conversion de 100% étant obtenu en présence de l'ester *tert*-butylique de glycine (Dettori, 2017).

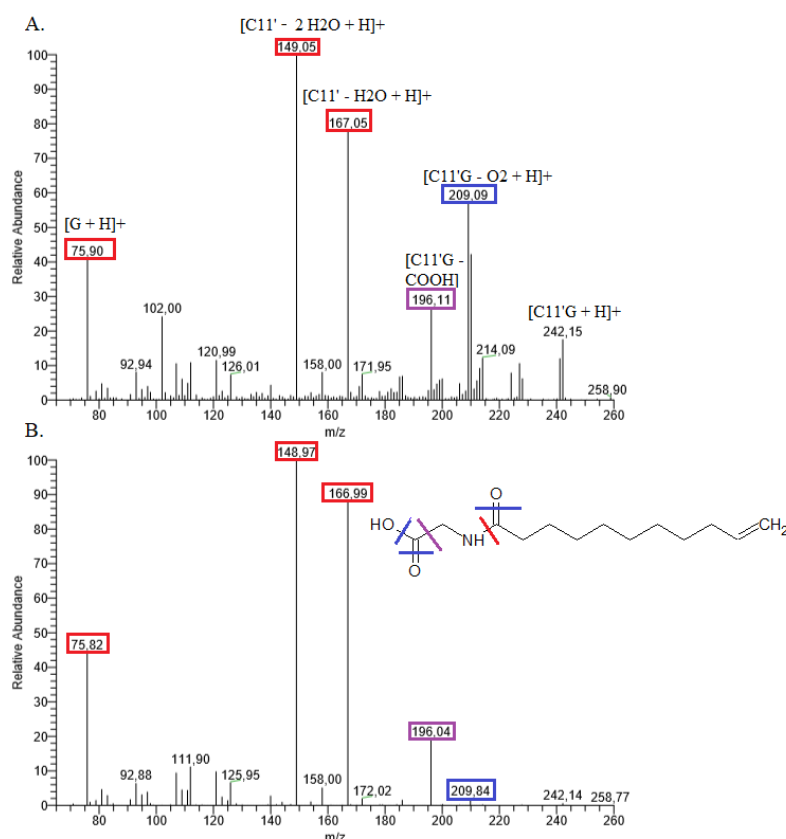


Figure 3.2 : fragmentation MS2 du 10-undécénoyl-glycine A. fragmentation MS2 du produit de la réaction de synthèse en présence de CALB B. fragmentation MS2 du produit de référence

L'acylation des acides aminés autres que la lysine et la glycine n'a pas pu être réalisée en présence de CALB dans les conditions réactionnelles appliquées. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'expliquer cette absence de réaction. Tout d'abord, la faible solubilité des acides aminés dans les solvants organiques tels que le 2-méthyl-2-butanol, mais aussi peut-être, une faible spécificité de CALB vis-à-vis des acides aminés. Le manque de données dans la littérature sur l'acylation des acides aminés catalysée par les lipases ne nous permet cependant pas de confirmer cette seconde hypothèse. La faible solubilité des molécules polaires dans les solvants organiques a souvent été pragmatiquement considérée comme la cause de la faible activité des lipases pour l'acylation de ces molécules (Soo et al., 2003b ; Zhang et al., 2005 ; Husson et al., 2009b ; 2011 ; Durand et al., 2015b). Afin de remédier à ce problème, plusieurs stratégies peuvent être envisagées, soit par la modification de la structure du substrat afin d'améliorer sa solubilité, ou par l'utilisation de solvant réactionnel plus adapté. La première stratégie a montré une certaine efficacité mais nécessite le passage par plusieurs étapes de protection et déprotection du groupement carboxylique par l'utilisation de solvants organiques (Goujard et al., 2004). Cependant, l'objectif de ce travail est de trouver le moyen de réaliser la

N-acylation des acides aminés tels que la phénylalanine en réduisant au maximum les étapes de production et en utilisant des milieux réactionnels éco-compatibles, dans des conditions respectueuses de l'environnement. A cet effet, la deuxième stratégie semble la plus adaptée. Plusieurs milieux réactionnels permettant une meilleure solubilisation des molécules polaires et apolaires avec des propriétés physiques et physicochimiques très attractives ont été décrits dans la littérature. L'émergence de solvants réactionnels tels que les liquides ioniques, les solvants eutectiques profonds, le CO<sub>2</sub> supercritique ou la combinaison de plusieurs solvants (milieux biphasique) ont ouvert une multitude de possibilités faisant apparaître des potentialités alors peu connues chez les lipases (Lozano, 2010b ; Durand et al., 2013a ; Gérard et al., 2017b). Les liquides ioniques, en dépit de quelques inconvénients, ont été considérés comme une alternative prometteuse. Certains d'entre eux permettent en effet une amélioration de la solubilisation des deux composés polaire et apolaire (selon le solvant préparé) ce qui permet, dans certaines études, d'améliorer l'activité lipasique (Husson et al., 2008b). En revanche, certaines études ont montré une certaine toxicité de ces derniers vis-à-vis de l'environnement ; en plus de la complexité amont de leur synthèse, conduisant à des coûts très dissuasifs pour un développement industriel (Costa et al., 2017). C'est pourquoi, ce type de solvant n'a pas été évalué dans cette étude. Les solvants eutectiques profonds appartiennent à la même catégorie que les solvants ioniques mais avec une voie de préparation plus simple qui fait appel à des molécules naturelles biodégradables (on parle alors de NADES, Natural Deep Eutectic Solvant). Leur coût est aussi, de ce fait, bien moindre. Le CO<sub>2</sub> supercritique est lui l'un des solvants réactionnels les plus écologiques, permettant la solubilisation des molécules, en particulier apolaires (ou polaires mais avec des volatilités assez élevées). Un objectif de ce travail étant de pouvoir produire une des molécules à intérêt cosmétique industriel qui est le 10-N-undécénoyl-phénylalanine, nous avons donc souhaité focaliser nos travaux sur cette réaction d'acylation de la phénylalanine par l'acide 10-undécénoïque, afin d'évaluer les performances catalytiques obtenues dans les différents solvants réactionnels mentionnés ci-dessus.

### 3.3 Acylation enzymatique sous CO<sub>2</sub> supercritique

Le CO<sub>2</sub> supercritique est un solvant très prometteur en raison de son éco-compatibilité et de sa disponibilité. De plus, les conditions pour atteindre le point critique sont assez douces (pression de 73 Bars et température de 31°C), ce qui permet de préserver l'intégrité structurale des enzymes et des molécules thermolabiles. L'avantage principal de ce solvant réside dans ses propriétés physiques dont sa densité qui est comparable à celle des liquides et sa diffusivité qui est comparable à celle d'un gaz, avec une viscosité également proche de celle d'un gaz. On peut

ajuster le pouvoir solvant du CO<sub>2</sub> supercritique en augmentant sa densité par action sur le couple pression-température. Avec des substrats apolaires et grâce à sa très faible viscosité, le CO<sub>2</sub> supercritique permet de faciliter l'accès des substrats au site actif de l'enzyme (en général immobilisée dans des support poreux polymériques), ce qui peut améliorer considérablement l'activité (Dumont et al., 1992). Cependant, son caractère hydrophobe demeure incompatible avec l'utilisation de molécules polaires et non volatiles tels que les acides aminés, conduisant à une très faible solubilité de l'ordre de 10<sup>-7</sup> à 10<sup>-8</sup> en fraction molaire (Vedaraman et al., 2004b ; Payne, Kerton, 2010). Plusieurs réactions d'acylation enzymatique de la phénylalanine et de la glycine avec l'acide 10-undécénoïque et l'acide octanoïque pour la production du 10-undécénoyl-phénylalanine (C11'F) et l'octanoyl-glycine (C8G), respectivement, ont été réalisées en utilisant CALB immobilisée (Lipozyme 435, Novozymes, Danemark). La lipase utilisée a été préalablement conservée dans une jarre hermétiquement fermée contenant une solution saturée de chlorure de lithium afin de réguler l'activité de l'eau des billes d'enzyme à 0,11. Les réactions ont été réalisées suivant les conditions présentées dans le tableau 3.1. Afin de réduire la quantité d'eau apportée dans le système, un faible débit d'alimentation des substrats a été imposé. Par ailleurs, la solubilité de la glycine dans le tampon étant bien plus importante que celle de la phénylalanine dans le tampon et étant limité par le débit d'alimentation du réacteur, les concentrations finales étaient elles-mêmes très limitées par l'installation.

A la fin de la réaction, un important dépôt blanc a été observé au niveau du mélangeur statique (Figure 3.3 A). L'analyse des produits après 1 h de réaction n'a pas montré d'apparition de produit à base de phénylalanine ou de glycine. Ceci peut s'expliquer par le fait que le CO<sub>2</sub> supercritique est tout de même capable de solubiliser de très faibles quantités d'eau et ainsi de limiter le rôle de cosolvant de cette dernière, en favorisant la précipitation de l'acide aminé. On parle alors d'effet anti-solvant du CO<sub>2</sub> supercritique. La précipitation a été observée principalement au niveau du mélangeur statique mais aussi dans le tubing. Comme il a été démontré qu'il n'y avait pas d'impact significatif de la variation de pression et de température sur la solubilité ultra faible des acides aminés tels que la phénylalanine dans le CO<sub>2</sub> supercritique, la modification du système par l'amélioration du contact entre les deux substrats et l'enzyme est apparue comme une source d'amélioration potentielle de cette faible solubilité (Gao et al., 2002).

Tableau 3-1 : conditions réactionnelles lors de la synthèse du C11'F et du C8G sous scCO<sub>2</sub>

Conditions	C11'F	C8G
Réacteur	Lit fixe	
iCALB (Lipozyme 435)	300 mg	
Pression/température	200 Bars / 55°C	
Débit de scCO <sub>2</sub>	3 mL / min en liquide et 3.94 mL/min en scCO <sub>2</sub>	
Solution d'acide aminé (préparé soit dans du tampon tris HCl 25 mM ou de l'éthanol)	Phénylalanine (20 g/L)	Glycine (118 g/L)
Acide gras	Acide 10-undécénoïque	Acide octanoïque
Débit des substrats	0.025 mL/min	0.025 mL/min
Ratio molaire AG/AA	243 / 6	157 / 39

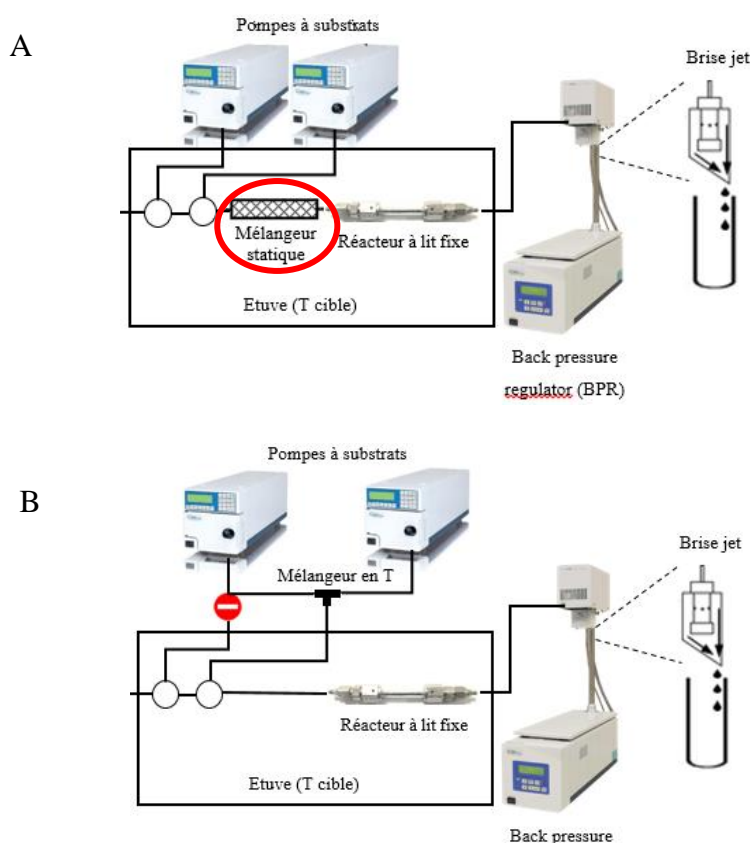


Figure 3.3 : configuration du système sous scCO<sub>2</sub> utilisé A. configuration initiale B. configuration modifiée

Afin de remédier à ce problème, quelques modifications sur l'équipement utilisé ont été réalisées dans le but de réduire au maximum le volume mort. Elles consistent à remplacer l'utilisation du mélangeur statique, qui correspond au lieu de précipitation des acides aminés, par un mélangeur en T, mis en place avant introduction des substrats (figure 3.3.B). Cela permet de préparer un mélange émulsionné (huile/eau/acide aminé) avant le contact avec le scCO<sub>2</sub>, qui

va être fortement amélioré au contact avec le scCO<sub>2</sub> par effet de cisaillement, sachant que le débit global d'introduction des substrats est de 0,05 mL/min contre 3,94 mL/min pour le scCO<sub>2</sub>. Afin de tester l'efficacité du système, la réaction de synthèse du 10-undécényl-phénylalanine dans les mêmes conditions précédentes a été mise en œuvre. Les premières observations ont montré que ces petites modifications ont permis d'avoir un meilleur rendement de récupération qui peut aller jusqu'à 70 % au lieu d'environ 20 % avec le système initial. Ceci peut être expliqué par l'amélioration de l'entraînement des deux substrats en même temps par le CO<sub>2</sub> sans précipitation importante de l'acide aminé. Cependant, une très faible quantité de produit a été obtenue, observée par LC-MS-MS. L'utilisation de co-solvant tel que l'éthanol n'a pas permis d'améliorer ces rendements. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer les résultats obtenus. L'utilisation du tampon pour la solubilisation des acides aminés peut engendrer une augmentation de l'activité de l'eau à la surface des billes de CALB, qui devrait être inférieure à 0,2, ce qui perturbe l'activité synthétique de l'enzyme (Humeau et al., 1998). Il est possible d'évaluer la quantité d'eau qui peut-être solubilisée par le CO<sub>2</sub> supercritique dans ces conditions (55°C, 200 bars) connaissant la masse volumique de ce dernier ( $\rho = 754.1 \text{ kg/m}^3$ ) et en utilisant la corrélation de Chrastil :  $C = \rho^k e^{\left(\frac{A}{T+B}\right)}$  sachant que k, A et B sont des constantes (A = -2826,4, B = -0,81, k = 1,549).  $C = 754.1^{1.549} \times e^{\left(\frac{-2826,4}{328.15} - 0.81\right)} = 0,00231 \text{ kg/m}^3 = 2,31 \text{ mg d'eau/L de CO}_2$ .

En d'autres termes, 1 L de CO<sub>2</sub> supercritique à 55°C et 200 bars peut solubiliser 2,31 mg d'eau. Sachant que le débit de CO<sub>2</sub> est de 3 mL/min pendant 60 minutes. Le volume de CO<sub>2</sub> final est de 180 mL donc la quantité d'eau qui peut être solubilisée est de 0,416 mg, alors que la quantité d'eau apportée était de 1,5 g (Q = 0,025 mL/min). Cela signifie qu'une importante quantité d'eau reste dans l'installation. En plus du risque de changer l'équilibre thermodynamique de la réaction vers la réaction d'hydrolyse, la dissolution du CO<sub>2</sub> dans l'eau conduit à l'apparition d'acide carbonique, provoquant une acidification du microenvironnement aqueux de l'enzyme. Ce dernier peut se dissocier par la suite pour former des ions bicarbonate provoquant des perturbations de l'activité enzymatique. Ce phénomène a été mis en cause lors de la perte d'activité enzymatique en milieu biphasique eau/scCO<sub>2</sub> par certains auteurs. Afin de remédier à cela, ils ont pu éviter la dissociation de l'acide carbonique par l'ajout de bicarbonate de sodium permettant d'améliorer l'énantio-sélectivité de l'alcool déshydrogénase utilisée (Harada et al., 2009b). Les anions bicarbonates formés après dissociation de l'acide carbonique peuvent réagir avec l'amine secondaire des lysines présentes à la surface de l'enzyme formant ainsi des

carbamates. La carbamatation de la lysine peut influencer significativement l'activité enzymatique. En effet, certains auteurs décrivent une inactivation de l'activité de la lipase de *Candida rugosa* lors de la réaction d'estérification du citronellol avec l'acide n-butyrique. La perte d'activité était reliée à la carbamatation des lysines présentes au niveau du site actif réduisant l'accessibilité à ce dernier (Habulin, Željko Knez, 2001). CALB présente aussi des résidus lysine situés à sa surface dont 5 sont présents du côté opposé au site actif et une autre proche de l'entrée de la cavité catalytique. Dos Santos et al (2016) ont observé la perte d'activité de CALB immobilisée (Lipozyme 435) lors de la réaction d'estérification de l'acide oléique avec le méthanol sous  $scCO_2$ , en mode batch. L'analyse structurale de l'enzyme par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a montré une différence d'absorption entre l'enzyme utilisée et non utilisée à un nombre d'onde de  $1735\text{ cm}^{-1}$  environ très proche de la plage de nombre d'onde de  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  couramment considérée comme correspondant aux amides primaires (figure 3.4). Ce changement conformationnel de la structure secondaire de l'enzyme immobilisée correspondrait, selon les auteurs, à la formation de liaisons covalentes avec les groupements amine. Il s'agirait de liaisons carbamates sur l'enzyme induisant une réduction de son activité enzymatique (Dos Santos, Rezende, et al., 2016b). Dans le cadre des essais de synthèse de C11'F et C8G, en raison de l'humidité perturbant l'analyse, ces données n'ont pas été considérées comme fiables. Un procédé de séchage thermique pourrait permettre de résoudre le problème mais conduit hélas à la rupture des liaisons carbamates, ce qui fausserait aussi les résultats (Matsuda, 2013b). Les résultats des analyses FTIR des réactions de production d'acétate de géraniol que nous avons menées en réacteur continu présentaient néanmoins les mêmes tendances que celles observées par Dos Santos et al (2016). En effet, une variation de la transmittance a été observée en particulier au niveau du nombre d'onde  $1735\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux liaisons amides primaires (Figure 3.5.A). Par ailleurs, ce nombre d'onde correspondant aussi aux vibrations des liaisons esters présentes au niveau du produit de la réaction (acétate de géraniol), l'interprétation des résultats a été plus compliquée (Figure 3.5.B). C'est pourquoi, ces résultats n'ont pas été présentés dans cette étude mais l'hypothèse d'une perturbation de l'activité enzymatique après formation des carbamates à la surface de l'enzyme reste la plus probable pour justifier l'absence d'activité en se basant sur la littérature (Dos Santos, Rezende, et al., 2016b). Certains auteurs ont proposé des solutions au problème de carbamatation de la lysine de surface de CALB par la protection des groupements amine de la chaîne latérale de la lysine. Monhemi et Housaindokht (2016) ont réalisé une étude *in silico* sur les modifications chimiques de CALB permettant d'augmenter la stabilité de l'enzyme sous  $scCO_2$ . Ils ont démontré que l'acétylation des résidus lysine permettait de protéger l'enzyme

contre la dénaturation thermique dans l'eau mais ils n'ont pas observé de stabilisation sous  $\text{scCO}_2$ . Par contre, une carboxylation et une méthylation de ces résidus permettaient une bien meilleure protection contre la carbamatisation de ces résidus sous  $\text{scCO}_2$ . Sachant que ces carbamates sont formés par l'interaction entre les ions bicarbonate et les groupements amine, les amines libres des acides aminés utilisés comme substrats peuvent aussi former des carbamates. Dans ce cas, les amines libres réactives ne sont plus disponibles pour la réaction, ce qui rend la réaction de N-acylation impossible dans ces conditions. Afin d'éviter ou de réduire l'apport d'eau dans le système, des réactions ont été effectuées soit en déposant directement une certaine quantité de l'acide aminé sur le lit de billes de CALB à l'extrémité du réacteur à lit fixe par laquelle le deuxième substrat (acide gras) et le  $\text{CO}_2$  rentrent, ou par l'introduction d'un débit moins important de substrat ( $7 \mu\text{L} / \text{min}$ ) et donc moins d'eau ( $420 \text{ mg}$  total solubilisable par le  $\text{CO}_2$ ). Les analyses n'ont pas montré d'apparition de produit sans doute à cause des trop faibles concentrations en substrat (acide aminé) solubilisé et produit (amide) entraîné par le  $\text{scCO}_2$

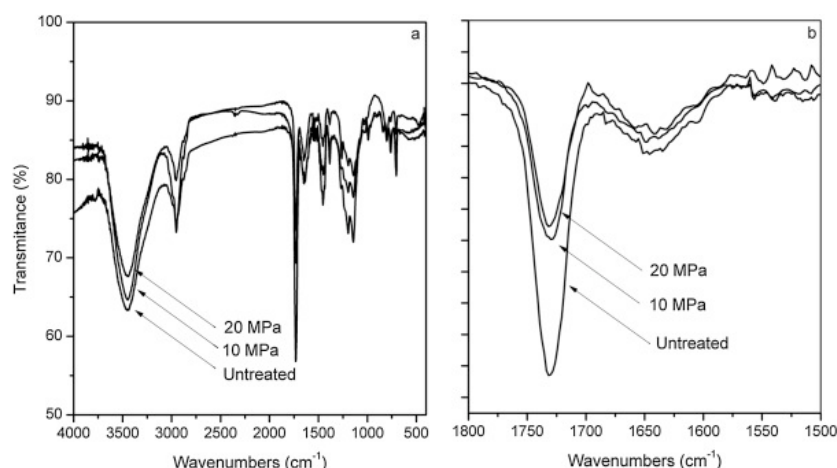


Figure 3.4 : spectre FTIR de CALB immobilisé non traité et traité avec du  $\text{scCO}_2$  pendant 1 h à 10 MPa et 6 h à 20 MPa et à  $40^\circ\text{C}$  a. spectre FTIR complet b. spectre FTIR normalisé à un intervalle de nombre d'ondes de  $1800\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$  (Dos Santos, Rezende, et al., 2016b)



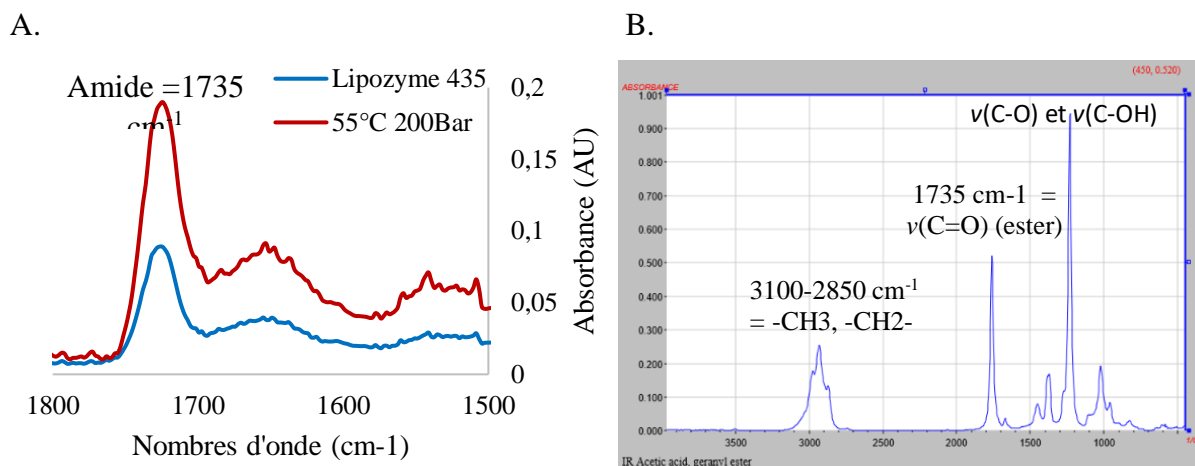


Figure 3.5 : A. spectre FTIR normalisé à un intervalle de nombre d'ondes de 1800-1500 cm<sup>-1</sup> de CALB immobilisée (Lipozyme 435) avant et après traitement (55°C 200 Bar) avec du scCO<sub>2</sub> pendant 30 min à 200 Bar et à 55°C B. spectre FTIR caractéristique de l'acétate de géranol

Etant donné les problèmes de solubilité des acides aminés sous scCO<sub>2</sub> et les problèmes liés à l'interaction du CO<sub>2</sub> avec les amines libres (ceux des résidus lysine de surface de l'enzyme et ceux des acides aminés utilisés comme substrats), il a été nécessaire d'envisager d'autres systèmes réactionnels que le scCO<sub>2</sub>, qui n'est pas adapté aux réactions de N-acylation d'acides aminés. Pour cette réaction, il a été recherché des milieux liquides permettant la solubilisation des substrats tels que les acides aminés, avec une activité d'eau assez faible pour maintenir une bonne activité des lipases. Les solvants eutectiques profonds (DES en Anglais) entrent dans ce cadre.

### 3.4 Acylation enzymatique en solvants eutectiques

Les solvants eutectiques représentent une alternative intéressante au CO<sub>2</sub> supercritique pour le type de réaction envisagé. En effet, leur non-volatilité, leur faible toxicité, leur biocompatibilité, leur biodégradabilité en plus de leur disponibilité à faible coût les a rendu très attractifs pour diverses applications (Qinghua Zhang et al., 2012 ; Hayyan, Hashim, Hayyan, et al., 2013 ; Durand et al., 2013b). Leur faible activité de l'eau permet de maintenir des conditions réactionnelles favorables aux lipases. Plusieurs études ont démontré de meilleures performances des biocatalyseurs enzymatiques dans ce genre de solvant réactionnel par rapport aux liquides ioniques et solvants organiques (Gorke et al., 2008b ; Zhao et al., 2011). La biocatalyse par l'utilisation des lipases dans ces milieux a aussi largement été décrite. Parmi les lipases évaluées, plusieurs auteurs ont mis en évidence la supériorité catalytique de CALB par rapport aux autres enzymes dans ces milieux réactionnels pour plusieurs réactions telles que la transestérification et l'alcoololyse (Gorke et al., 2008b ; Zhao et al., 2013b ; Durand et al., 2013a).

Une multitude de solvants eutectiques ont été utilisés pour des réactions de synthèse et d'hydrolyse (Pätzold et al., 2019). Parmi ces derniers, les mélanges eutectiques profonds choline chloride / urée (ccu) et choline chloride / glycérol (ccg) sont les plus utilisés pour les réactions avec CALB (Gorke et al., 2008b ; Durand et al., 2012b). Ces solvants eutectiques se caractérisent par une température de fusion basse (12 et -40°C, respectivement), une viscosité qui varie beaucoup selon la température (ccu : 750 cP à 25°C → 169 cP à 40°C, ccg : 376 cP à 20°C → 79 cP à 50°C) et une polarité similaire (0,84 selon le concept de Reichardt's Dye 30) (Durand, 2013b). Durand et al (2013) ont aussi montré une bonne activité de CALB dans ces deux solvants pour la réaction d'alcoolyse entre des composés phénoliques et le butanol avec une meilleure activité dans le milieu choline chloride / urée. La détermination du pH des deux solvants, au ratio molaire sel d'ammonium / donneur de liaison hydrogène (DLH) de 1/2, a montré un pH aux alentours de 8 en présence d'urée comme DLH et de 4 en présence de glycérol comme DLH. Un pH bas (très) inférieur au pKa des amines (de l'ordre de 9) implique une faible proportion voire une absence totale d'acides aminés ayant leur(s) amine(s) sous forme NH<sub>2</sub>, au profit de la forme chargée NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Ceci est susceptible de réduire les interactions enzyme / substrat, ce qui pourrait expliquer la faible activité observée en présence de glycérol. De manière intéressante, l'ajout d'environ 10 % d'eau minimum est apparu nécessaire pour observer une activité enzymatique maximale avec une meilleure stabilité de l'enzyme, la baisse de viscosité liée à l'eau ajoutée améliorant sans doute les transferts de matière enzyme-substrat (Durand et al., 2013b). En revanche, la présence d'une quantité trop élevée d'eau a conduit à un changement de l'équilibre thermodynamique de la réaction en faveur d'une réaction d'hydrolyse (Durand et al., 2014). Au-delà de l'amélioration de l'activité par ajout d'eau, un changement de sélectivité de l'enzyme a aussi été observé lors de la transestérification du vinyl laurate avec des alcools de différentes longueurs de chaîne, ce qui pourrait être le cas lors de l'acylation des acides aminés (Durand et al., 2012b). Sur la base de ces données et afin d'évaluer la possible utilisation de ces solvants pour la N-acylation d'acides aminés, le mélange eutectique profond (MEP) choline chloride / urée avec un ratio molaire de 1/2 a été utilisé. Avant de débiter les réactions, un suivi de l'évolution de l'activité de l'eau (a<sub>w</sub>) en fonction de la quantité d'eau ajoutée a été réalisé dans le but d'atteindre une a<sub>w</sub> de l'ordre de 0,2 nécessaire au bon fonctionnement de CALB. Les résultats représentés dans la figure 3.6 montrent que l'ajout de 10 % d'eau permet d'atteindre rapidement une a<sub>w</sub> d'environ 0,2 en partant d'une a<sub>w</sub> initiale de 0,03 ; ce qui est en concordance avec les résultats de Durand et al., (2013) où la même quantité d'eau a été nécessaire pour avoir une bonne activité enzymatique (Durand et al., 2013a). L'équilibration de l'a<sub>w</sub> a aussi été réalisée par la méthode des microclimats, par

l'utilisation d'une solution saturée de fluorure de potassium ( $a_w = 0,27$ ) mais un temps d'attente de plus de trois semaines a été nécessaire pour atteindre une  $a_w$  de 0,19.

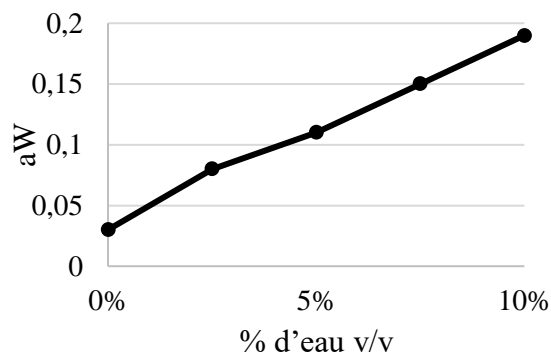


Figure 3.6 : suivi de l'évolution de l'activité de l'eau du mélange eutectique profond choline chlorure / urée (ratio molaire 1 / 2) en fonction de la quantité d'eau ajoutée.

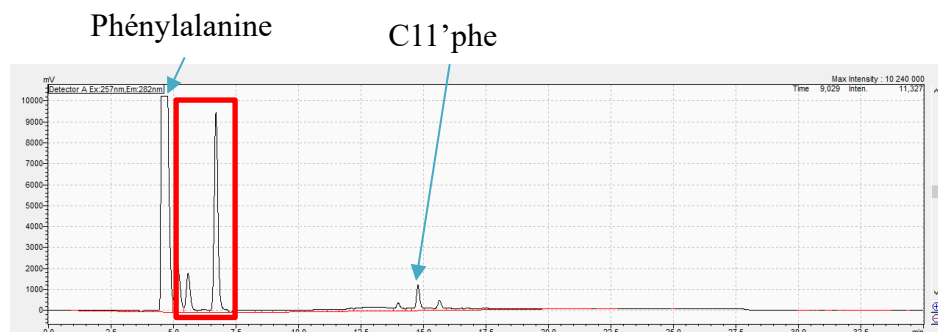
Plusieurs réactions ont alors été mises en œuvre sous différentes conditions expérimentales dans ce solvant eutectique (tableau 3.2). Initialement, CALB immobilisée commerciale (Lipozyme 450) a été utilisée pour les réactions d'acylation de la phénylalanine sous différentes conditions de température, de ratio molaire entre substrats et de concentration d'enzyme. Les résultats ont montré l'apparition d'une quantité très faible de phénylalanine N-acylée, non quantifiable, quelles que soient les conditions testées. Ce résultat pourrait être attribué à l'importante viscosité de ces solvants et qui peut engendrer des limitations de transfert de matière (Abbott et al., 2004). Afin de vérifier cela, des réactions ont été effectuées à 45°C, en présence d'enzymes non immobilisées : CALB libre ainsi que la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TL100) et celle de *Mucor miehei* (Palatase). Les résultats de l'acylation enzymatique de la phénylalanine avec l'acide undécénoïque ont montré l'apparition d'une quantité faible mais quantifiable de produit en présence de ces trois lipases avec une meilleure activité en présence de CALB (TL100 : 0,12 g/L, Palatase : 0,39 g/L et CALB : 0,56 g/L) après 48 h de réaction. Cela confirme le problème de transfert de matière en présence de la CALB immobilisée. Par ailleurs, lors de l'analyse par HPLC et détection fluorimétrique aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la phénylalanine (257 et 282 nm respectivement), plusieurs pics de produits secondaires ont été observés dans tous les cas (en présence et en absence d'enzyme libre ou immobilisée). Cette apparition est accompagnée d'une réduction de la hauteur du pic de la phénylalanine qui va réagir avec l'un des constituants du solvant eutectique et qui dépend de la température de la réaction (apparition favorisée par l'augmentation de la température) (figure 3.7.a et b).

Tableau 3-2 : Résultats en solvants eutectiques après 24h, à une activité d'eau de 0,2

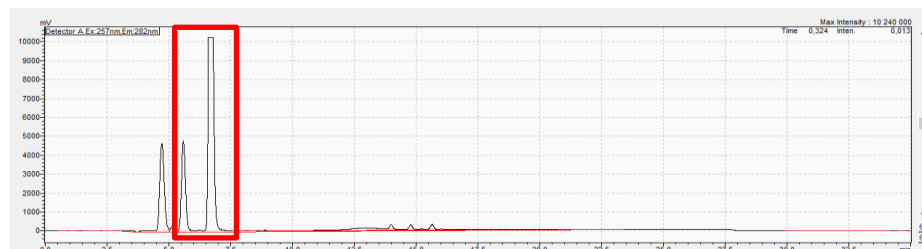
Conditions réactionnelles		Quantification de la concentration de C11'F par HPLC-fluorimétrie
Choline chlorure / Urée (1/2)	Enzyme : CALB immobilisée (Lipozyme 435) à 2, 4, 10 et 20 g/L Ratio AG/AA: 0,24 / 0,12 ; 0,2 / 0,05 ; 0,1 / 0,1 T°C = 55 ± 5°C et 45 ± 5°C	Produit non quantifiable par fluorescence (très faible quantité visible en LC-MS) Apparition de plusieurs composés secondaires
	Enzyme : Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TL100), Lipase de <i>Mucor miehei</i> (Palatase) et Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) libre à 0,5 g/L Ratio AG/AA: 0,24 / 0,12 T°C = 40 ± 5°C	TL100 = 0,12 g/L (0,3%) Palatase = 0,39 g/L (1%) CALB = 0,56 g/L (1,4%) Apparition de plusieurs composés secondaires
Choline chlorure / Glycérol (1/2)	CALB libre et immobilisée Ratio AG/AA: 0,24 / 0,12 et 0,1 / 0,1 T°C = 50 ± 5°C	Absence de produit visible par fluorescence Absence de composés secondaires,

Afin de confirmer le fait que la faible activité était due aux réactions secondaires avec le solvant, des réactions en présence du mélange choline chlorure / glycérol comme solvant dans les mêmes conditions, ont été effectuées. Les analyses en HPLC-fluorimétrie ne montrent pas de variation sur le pic de la phénylalanine et, logiquement, aucun produit secondaire n'est observé (figure 3.7.c). Cela signifie que les produits secondaires apparus avec le couple choline chlorure / urée (1/2) résultent de l'interaction de l'urée avec l'acide aminé, ce qui réduit considérablement la quantité de substrat disponible pour les réactions de synthèse. Le fait que les réactions en présence du mélange choline chlorure/ glycérol n'ont pas permis de production de l'acide aminé acylé pourrait être lié d'une part à la viscosité du milieu et d'autre part à la forte acidité du solvant qui modifie l'état d'ionisation de l'enzyme (et de l'acide aminé), modifiant ainsi les performances (Durand et al., 2013b).

a.



b.



c.

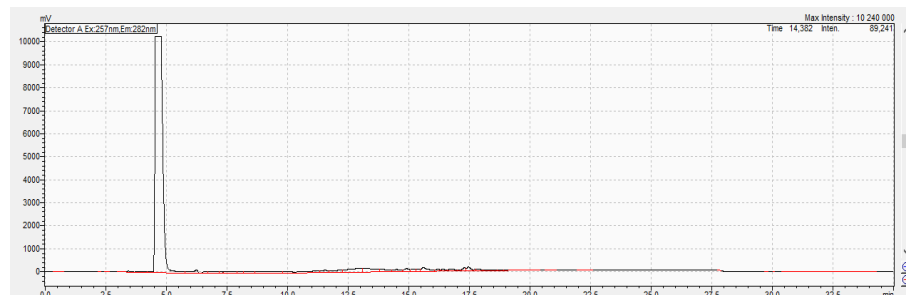


Figure 3.7: chromatogrammes HPLC-fluorimètre des mélanges réactionnels a. Réaction d'acylation de la phénylalanine en présence de 0,5 g/L de CALB libre dans de la choline chlorure / urée réalisé à  $45 \pm 5^\circ\text{C}$ , b. Réaction d'acylation de la phénylalanine en présence de 10 g/L de CALB immobilisé dans de la choline chlorure / urée réalisé à  $55 \pm 5^\circ\text{C}$ , c. a. Réaction d'acylation de la phénylalanine en présence de 0,5 g/L de CALB libre dans de la choline chlorure / glycérol réalisé à  $55 \pm 5^\circ\text{C}$

Au regard des résultats obtenus en solvants eutectiques et de la présence de molécules secondaires indésirables, les réactions en solvants eutectiques profonds n'ont pas abouti aux résultats escomptés. D'autres milieux tels que les milieux biphasiques ont été envisagés, en s'appuyant sur le caractère catalytique interfacial de la lipase.

### 3.5 Acylation enzymatique en milieu biphasique

Etant donné les faibles taux de conversion obtenus dans les milieux monophasiques précédemment présentés, liés principalement à des problèmes de solubilité, de transfert de matière ainsi qu'à la formation de co-produits, l'utilisation d'autres systèmes réactionnels associant deux solvants de polarité différente a été envisagée. Ces milieux biphasiques ont été largement décrits et utilisés dans la littérature pour des réactions faisant réagir deux substrats

de polarité opposée ou simplement pour l'amélioration de performances réactionnelles des enzymes (Oliveira, Rosa, 2006 ; Lozano, 2010b ; Vobecká et al., 2018). Plusieurs milieux biphasiques associant des milieux apolaires tels que le CO<sub>2</sub> supercritique, les solvants organiques ou par l'utilisation d'huile, qui jouera le rôle de solvant et de substrat, et des milieux polaires tels que l'eau, les solvants eutectiques et les liquides ioniques ont été utilisés pour de la biocatalyse en présence de lipases (Keskin et al., 2007b ; Kraai et al., 2008 ; Gérard et al., 2017b ; 2017a ; Hommes et al., 2019). Dans notre étude, nous avons utilisé le système tampon (tris base pH 8) / décane (50/50) pour l'évaluation de l'activité de CALB libre (0,5 g/L) lors de la réaction de N-acylation de la phénylalanine (F : 0,12 M) avec l'acide undécénoïque (C11' : 0,24 M) à 55°C sous forte agitation (1200 rpm) pour maximiser les interactions enzyme-substrats. Sachant que le décane présente un log P supérieur à celui du C11' et du produit acylé (C11'F) cela pourrait favoriser la solubilisation de l'acide gras améliorant son accès au site actif (tableau 3.3). L'analyse du milieu en HPLC-fluorimétrie et LC-MS-MS n'a malheureusement pas montré l'apparition de produit acylé, après 48 h de réaction. D'autres réactions ont été menées dans des systèmes contenant de l'hexane au lieu du décane ou en milieu fondu (l'acide undécénoïque), mais aucun produit acylé n'a été observé. Les résultats décrits dans la littérature ont été menés avec des enzymes présentant un volet moléculaire (lid) et une activation interfaciale efficace. Par ailleurs, CALB présente un volet moléculaire moins développé que plusieurs autres lipases ainsi qu'une faible activation interfaciale réduisant ainsi l'intérêt de travailler dans des systèmes biphasiques eau / solvant organique (Martinelle et al., 1995 ; Zisis et al., 2015).

Tableau 3-3 : logP des différentes molécules utilisées lors des réactions

Molécule	C11'	F	C11'F	Décane	Hexane	Eau
LogP	3,99	1,11	5,05	6,07	3,94	-1,38

Les résultats de l'acylation enzymatique dans les différents solvants réactionnels ont montré une très faible réactivité de CALB lors des réactions de N- $\alpha$ -acylation des acides aminés où dans les meilleurs des cas, 1,5 % de conversion a été obtenu en solvant eutectique, avec apparition de produits secondaires. Afin de vérifier si les faibles activités observées étaient effectivement liées à un problème de mise en œuvre du procédé ou à une mauvaise interaction entre l'enzyme et le substrat, et sachant que la structure de CALB est disponible, une étude par modélisation moléculaire a été réalisée.

### 3.6 Étude par modélisation moléculaire de l'acylation enzymatique des acides aminés, catalysée par CALB

Suite aux résultats obtenus lors de l'évaluation des performances de CALB dans différents milieux pour la réaction d'acylation des acides aminés, une étude *in-silico* des interactions entre CALB, le donneur d'acyle et les acides aminés a été menée. La structure cristallographique de CALB a été élucidée en 1994 par Uppenberg et al. ; depuis plusieurs études ont été réalisées afin de comprendre et d'anticiper le comportement de CALB dans les milieux réactionnels et de prédire la régio- et chimio-sélectivité de la lipase lors de l'acylation de différentes molécules polyfonctionnelles (Uppenberg et al., 1994a ; 1995 ; De Oliveira et al., 2009 ; Kumaresan et al., 2011 ; Ferrari et al., 2014a ; Stauch et al., 2015 ; L. Dettori, Jelsch, et al., 2018b). Selon Uppenberg et al. (1994), CALB présente une cavité catalytique d'une largeur de 10 Å × 4 Å et de 12 Å de profondeur et ne présente pas de volet moléculaire responsable du phénomène d'activation interfaciale. Elle comporte une triade catalytique (Ser105, His224 et Asp187) et un trou oxyanion constitué des résidus Thr40 and Gln106. Au cours du mécanisme catalytique, l'intermédiaire tétraédrique formé (dans les réactions d'acylation, cet intermédiaire résulte de la fixation du donneur d'acyle sur la sérine catalytique par une liaison covalente) est stabilisé par des interactions de type liaison hydrogène entre l'oxyanion et le groupement amine des deux résidus constituant le trou oxyanion, ainsi qu'avec l'hydroxyle de la chaîne latérale de la Thr40. Les autres résidus formant la cavité du site actif sont majoritairement des résidus hydrophobes aliphatiques (Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Val154, Ile189, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 et Ala286) ; on observe également quelques résidus polaires (Asp134 et Gln157) (Uppenberg et al., 1994a).

En 2009, De Oliveira et al., ont mené des travaux de modélisation sur l'acétylation de flavonoïdes (rutine et isoquercitrine), catalysée par CALB. Une méthodologie a été mise en place pour étudier les modes d'interaction des substrats au niveau de la cavité catalytique et identifier les complexes enzyme/substrats productifs, conduisant à l'acylation de ces molécules. Les auteurs se sont basés sur l'évaluation des distances entre les groupements potentiellement acylables du substrat et les résidus catalytiques de CALB (Ser105 et His224) et entre l'acyle à greffer et les résidus du trou oxyanionique (Thr40 et Gln106) ; les interactions de type liaison hydrogène entre les deux substrats et les résidus précités ont été analysées. Le travail de simulation débute par plusieurs étapes de stabilisation de la structure de l'enzyme après fixation du donneur d'acyle sur la sérine catalytique (Ser105) afin de maintenir une structure protéique la plus proche possible de la structure cristallographique et donc de la structure réelle de l'enzyme (De Oliveira et al., 2009). Par une approche méthodologique similaire, Ferrari et al.

(2014) ont prédit la régio- et la chimio-sélectivité de CALB lors de la N-acylation de plusieurs peptides avec l'acide oléique. Les résultats issus des modèles ont été confirmés expérimentalement. Ainsi, ces auteurs ont montré que CALB conduit spécifiquement à l'acylation du résidu lysine présent dans la structure des peptides étudiés, avec une sélectivité vis-à-vis de la fonction amine de la chaîne latérale (Ferrari et al., 2014a). Dettori et al., 2018 ont établi des conclusions similaires en réalisant une étude par modélisation moléculaire, suivie d'une étude des énergies d'interactions électrostatiques entre l'acyle-enzyme (lauroyl)-CALB et la lysine (Dettori et al., 2018b). D'autres auteurs ont utilisé les outils de modélisation moléculaire afin d'expliquer l'absence de réaction observée lors de l'acylation de la quercétine, catalysée par CALB à l'échelle expérimentale (Chebil et al., 2007b ; Bidouil et al., 2011). Ils ont pu justifier l'absence de réaction par de fortes interactions hydrophobes entre le flavonoïde et les résidus Ile189 et Ile285 qui stabilisent la molécule à l'entrée de la cavité du site actif, limitant ainsi son accès aux résidus catalytiques (Bidouil, Basilio De Oliveira, et al., 2011). Cette partie est consacrée à l'étude, à l'échelle moléculaire, de l'acylation des acides aminés, catalysée par CALB, en présence d'acides gras comme donneurs d'acyles. L'objectif est de trouver des éléments structuraux permettant de comprendre et d'expliquer les causes des faibles rendements observés dans les différents milieux réactionnels. Sur la base des données bibliographiques et des travaux réalisés antérieurement, qui stipulent que la sélectivité de l'enzyme est liée aux modes d'interaction entre les substrats et les résidus formant la cavité catalytique, plusieurs simulations ont été menées à l'aide d'outils de modélisation moléculaire. Parmi ces outils, le docking moléculaire est l'un des plus utilisés pour étudier les interactions entre une enzyme et son (ses) substrat(s). Cette méthode permet de prédire et de visualiser les interactions les plus probables entre un ligand et le site actif d'une enzyme. Dans le cas de cette étude, les substrats acides aminés sont définis comme des ligands dans le logiciel « Discovery studio » ; la cible de docking, quant à elle, est le modèle d'acyl-enzyme préalablement généré par l'établissement d'une liaison covalente entre le donneur d'acyle et la sérine catalytique (Ser105), puis optimisée.

Dans ce travail, l'acylation de la phénylalanine par l'acide oléique a été modélisée dans un premier temps. Des travaux antérieurs expérimentaux et de modélisation ayant déjà été menés par notre équipe avec cet acide gras, le modèle d'acyl-enzyme développé dans ce cadre a pu être utilisé comme cible de docking, sans modification.

Dans un second temps, la construction d'un modèle d'acyl-enzyme correspondant à l'acylation de phénylalanine par l'acide 10-undécénoïque a été réalisée suivant la méthodologie décrite par



De Oliveira et al. (2011) et par Ferrari et al. (2014) afin de positionner correctement la chaîne grasse dans la cavité enzymatique. Puis la géométrie du système a été optimisée par différentes étapes de minimisation de l'énergie potentielle du système et des simulations de dynamique moléculaire. La meilleure configuration générée a été utilisée comme cible pour les simulations de docking de différents acides aminés, afin d'évaluer leurs interactions avec la cavité catalytique.

Lors de cette étude, le module LibDock a été utilisé pour toutes les simulations de docking moléculaire. Dans ce protocole de docking, l'acyl-enzyme est considéré comme un élément rigide et le ligand (acide aminé dans notre cas) est considéré comme un élément flexible d'où l'appellation « Docking rigide ». Le protocole de docking de LibDock est basé sur l'algorithme développé par Diller, Merz, (2001). Il se déroule en plusieurs étapes comprenant la génération des conformations du ligand, l'identification des points d'ancrage (hotspots), l'évaluation des interactions possibles entre ces derniers et le ligand (docking) et enfin l'optimisation des complexes (poses) générés et leurs classements selon la probabilité d'apparition (scoring) (Rao et al., 2007). Le docking est réalisé suite à l'identification et le classement des points polaires et apolaires présents au niveau du site actif de l'enzyme. Cela permet de cartographier les hotspots qui seront utilisés pour évaluer les interactions hydrophiles et hydrophobes avec les atomes polaires tels les atomes d'hydrogène de l'accepteur d'acyle (interactions hydrogènes) ou les atomes apolaires tels les carbones (i.e. cycles aromatiques et chaînes aliphatiques), respectivement. L'étape d'optimisation consiste à retirer les poses qui ne sont pas favorables du point de vue stérique (problème d'accessibilité) en utilisant l'algorithme d'optimisation BFGS qui permet l'évaluation du potentiel stérique et des interactions hydrogène (Diller, Merz, 2001 ; Rao et al., 2007). Enfin, un consensus de score a été utilisé pour le classement des poses générées selon la probabilité de leur apparition.

### 3.6.1 Modélisation de l'acylation de la phénylalanine par l'acide oléique, catalysée par CALB

A l'échelle expérimentale, les réactions ont été menées dans du 2-méthyl-2-butanol (M2B2) en présence de triéthylamine en excès (2,4 M), de phénylalanine (0,12 M) et d'acide oléique (0,24 M). D'après l'analyse des milieux par HPLC, aucun produit ne se forme après 48 h de réaction. Afin d'essayer de comprendre ce résultat, des simulations de docking moléculaire ont été réalisées en utilisant le module Libdock du logiciel Discovery studio.

L'application du protocole de docking a permis de générer 97 poses, montrant divers positionnements et diverses orientations de la phénylalanine à l'intérieur du site actif (figure 3.8.a.1). Parmi elles, 76 poses présentent la phénylalanine à l'entrée du site actif (figure 3.8.a.2).

L'analyse des interactions au sein de ces complexes a montré la présence de plusieurs liaisons hydrophobes et hydrogène qui peuvent affecter fortement la mobilité de la phénylalanine et limiter son accès aux résidus catalytiques localisés au fond de la cavité. Selon les figures 3.8.b.1 et 2, le cycle aromatique de la phénylalanine peut interagir avec différents résidus hydrophobes aliphatiques localisés à l'entrée de la cavité, en particulier Leu140 et Ala141 ainsi que Thr156 et Leu144. On observe par ailleurs la présence de plusieurs liaisons hydrogène entre les groupements carboxyle et amine de la phénylalanine et plusieurs résidus de la cavité tels que Ser150, Val154 et Trp155.

D'autre part, 21 poses générées au cours du docking, montrent la phénylalanine à l'intérieur de la cavité, à proximité du site actif (entre 6 et 3 Å de distance entre le groupement carbonyle de l'acyl-enzyme et l'atome le plus proche de la phénylalanine) (figure 3.8.a.3). L'analyse de l'orientation de la phénylalanine au sein de ces complexes a montré que dans 7 poses, le cycle aromatique de la phénylalanine, qui ne porte pas de groupement fonctionnel, est orienté vers les résidus catalytiques de l'enzyme (figure 3.8.a.4). Dans ces 7 cas, des interactions hydrophobes entre le cycle aromatique de la phénylalanine et le résidu Ile189 ainsi que des liaisons hydrogène avec les résidus Val154 et Asp134 sont observées, pouvant expliquer l'obtention de ce genre d'orientation. De même, Bidouil et al., 2011 ont pu justifier l'absence d'acylation de la quercétine par la formation d'interactions hydrophobes avec les résidus Ile189 et Ile285, stabilisant la molécule à l'entrée du site actif de CALB, et causant l'absence de réaction (Bidouil, Basilio De Oliveira, et al., 2011). Dans les 14 autres poses présentant la phénylalanine à proximité du site actif, les groupements fonctionnels de l'acide aminé (carboxyle et amine  $\alpha$ ) sont orientés vers les résidus de la triade (Ser105, His224 et Asp187). Une analyse des distances impliquées dans le mécanisme catalytique a été menée afin de discriminer les poses pouvant conduire à l'acylation de la phénylalanine (poses qualifiées de productives), des poses non productives.

Plusieurs études antérieures ont montré l'importance de respecter des critères de distance interatomique au sein des modèles afin d'assurer la formation du 2<sup>ème</sup> intermédiaire tétraédrique menant à la formation de l'ester. La première de ces distances concerne le groupement nucléophile de l'accepteur d'acyle (amine dans notre cas) et la fonction carbonyle de l'acyl-enzyme afin qu'une attaque nucléophile puisse avoir lieu ; cette distance doit être inférieure à 4 Å. La deuxième distance d'intérêt concerne l'His224, qui intervient dans l'attaque nucléophile par transfert du proton du groupement nucléophile de l'accepteur d'acyle ; la valeur maximale de cette distance a également été fixée à 4 Å (De Oliveira et al., 2009 ; Bidouil, Basilio De Oliveira, et al., 2011 ; Ferrari et al., 2014a ; L. Dettori, Jelsch, et al., 2018b). Enfin, un troisième

critère a été défini, permettant de contrôler le maintien de la conformation du site actif. Il s'agit de la distance entre l'amine secondaire de l'His224 et la chaîne latérale de la Ser105. Les résultats obtenus ont montré que, parmi les 14 poses analysées, seulement 2 poses respectent les critères de distances précités (figure 3.8.c).

Ces analyses ont été complétées par l'étude des résultats du scoring, algorithme implémenté dans le module de docking. Celui-ci permet le classement des poses issues du docking, de la plus probable à la moins probable, en se basant sur la somme des énergies de Van der Waals et électrostatique, calculées au sein des complexes. Selon le classement des ligands générés, les poses présentant la phénylalanine à l'entrée du site actif sont les mieux classées selon les critères énergétiques précités, suivies par les poses présentant le cycle aromatique de la phénylalanine à proximité des résidus catalytiques. Les deux poses identifiées comme productives selon les critères de distance font parties des poses les moins bien classées. Sur la base de ces résultats, les modèles suggèrent qu'il est peu probable que l'acylation de la phénylalanine puisse avoir lieu, ce qui corrobore l'absence de réaction observée expérimentalement. En résumé, ceci pourrait s'expliquer par le positionnement préférentiel et la stabilisation de la phénylalanine à l'entrée de la cavité, limitant la diffusion du substrat vers les résidus catalytiques.

Afin d'élargir notre compréhension sur les mécanismes qui rentrent en jeu lors de la N-acylation, une étude par modélisation moléculaire a été menée pour étudier les modes d'interaction entre CALB, le donneur d'acyle et d'autres acides aminés, de structure et de polarités diverses. Dans ce travail, c'est l'acylation par l'acide 10-undécénoïque qui a été envisagée. Un modèle d'acyl-enzyme a été construit pour ce donneur d'acyle, en substituant l'acide oléique par l'acide 10-undécénoïque. Afin de générer un modèle robuste, plusieurs étapes de minimisation de l'énergie du système et une étape de dynamique moléculaire ont été appliquées afin de stabiliser la structure de l'acyl-enzyme tout en restant fidèle à la structure cristallographique initiale.

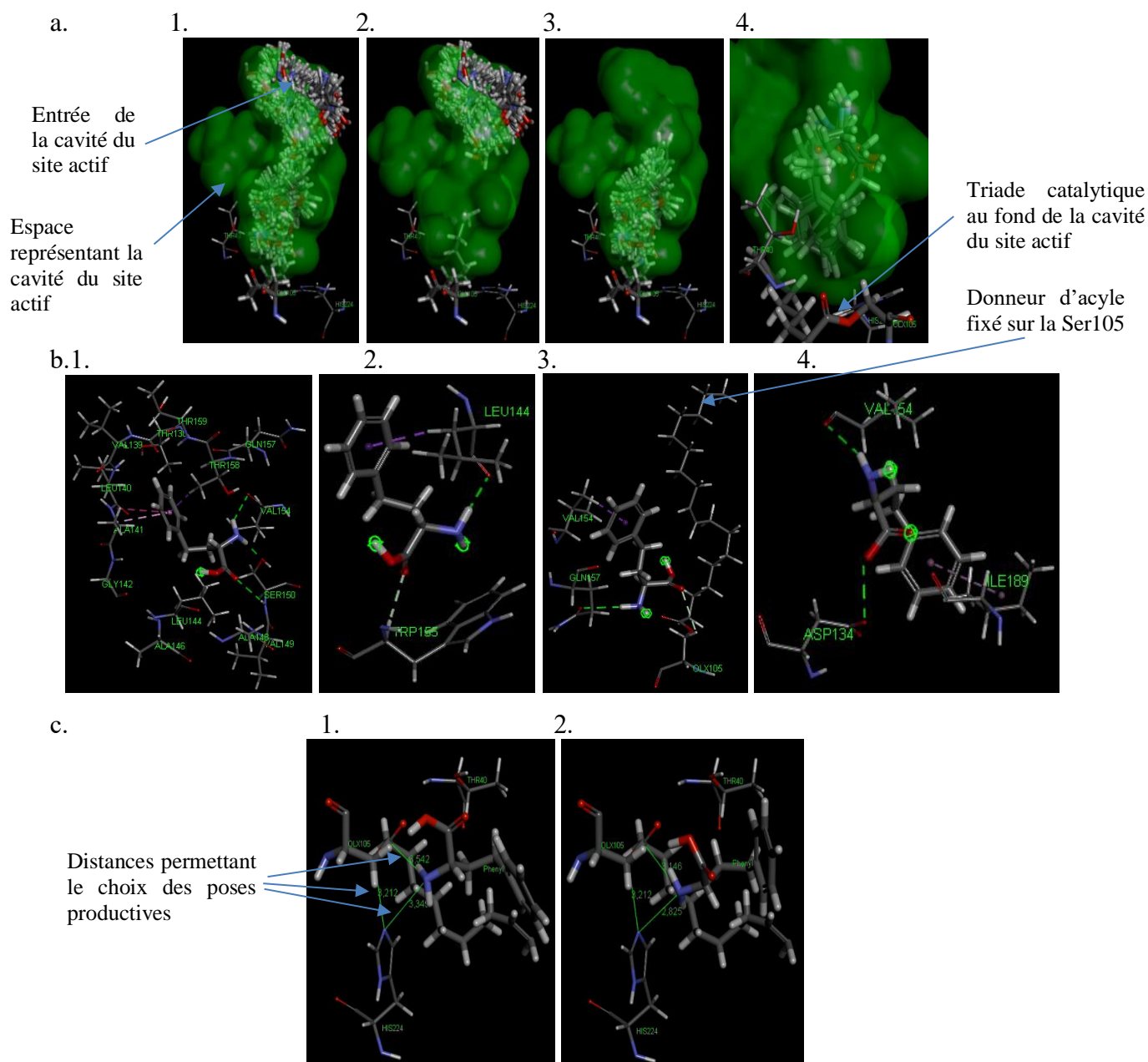


Figure 3.8 : analyse des poses issues du docking moléculaire de la phénylalanine avec l'oléoyl-CALB comme cible a. localisation et répartition des ligands générés au niveau de la cavité du site actif b. interactions moléculaires observées entre la phénylalanine et l'entrée du site actif (1 et 2) ; interactions moléculaires entre le site actif et la phénylalanine présentant son cycle aromatique vers les résidus catalytiques (3 et 4) (--- : interactions hydrophobes, --- : interactions hydrogènes) c. poses présentant la fonction amine de la phénylalanine à proximité des résidus catalytiques ; analyse des distances impliquées dans le mécanisme catalytique

### 3.6.2 Modélisation de l'acylation des acides aminés par l'acide undécénoïque, catalysée par CALB

#### 3.6.2.1 Construction du modèle d'acyl-enzyme C11'- CALB et sélection de la meilleure cible

Dans le cadre de cette étude, une nouvelle cible de docking, correspondant au système undécénoyl-CALB a dû être développée. La construction de ce modèle a été réalisée à partir de la structure de la cible oléoyl-CALB (C18:1-CALB) préalablement générée et optimisée lors de l'étude de Ferrari et al., 2014. Les 7 atomes de carbone formant l'extrémité  $\omega$  de la chaîne oléyle ont été supprimés et remplacés par un atome d'hydrogène. L'insaturation de la chaîne oléyle a été saturée. Afin d'optimiser la position de la nouvelle chaîne acyle dans la cavité de l'enzyme, le système a été solvato dans une boîte comportant 16585 molécules d'eau et de dimensions  $a = 92 \text{ \AA}$ ,  $b = 86 \text{ \AA}$ ,  $c = 70 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Plusieurs étapes de minimisation de l'énergie potentielle du système ont été menées, en appliquant une relaxation progressive du système selon le protocole décrit par De Oliveira et al. (2009) (Tableau 3.4). Le maintien de la structure native de l'enzyme a été contrôlé à chaque étape de minimisation *via* des mesures de RMSD.

Tableau 3-4 : Protocole de minimisation du système acyl-enzyme et résultats associés

Étape	Algorithme	Critères d'arrêt du calcul	Critère retenu	Energie potentielle (kcal/mol)	RMSD protéine
Fixation de toute la structure par des contraintes : tous les atomes sont fixes sauf les atomes d'H et l'eau de la cristallographie	Steepest descent	Max steps 10000 et/ou rmsd gradient 0,1	RMS gradient 0,1	- 343006,6 → - 958292,5	0
Fixation de la chaîne principale et contraintes harmonieuses appliquées aux chaînes latérales des résidus	Conjugate gradient	Max steps 10000 et/ou rmsd gradient 0,01	RMS gradient 0,01	- 855709,8 → - 870962,7	0
Fixation de la chaîne principale par des contraintes harmonieuses	Conjugate gradient	Max steps 100000 et/ou rmsd gradient 0,001	RMS gradient 0,001	- 841718,6 → - 862885,6	0,317
Relaxation de tout le système	Conjugate gradient	Max steps 100000 et/ou rmsd gradient 0,0001	RMS gradient 0,0001	- 863192,7 → - 867892,8	0,466
RMSD : changement conformationnel de la structure protéique après minimisation par rapport à la structure cristallographique initiale (doit être < 1) RMSD protéine entre le début et la fin du protocole de minimisation = 0,588					

Les étapes de minimisation ont permis une diminution importante de l'énergie potentielle du système passant de - 343006,6 kcal/mol en début de la simulation à -867892,8 kcal/mol à la fin. Une analyse des changements conformationnels au sein de la protéine par rapport à la structure cristallographique a été réalisée afin de vérifier l'absence de distorsions importantes du système. L'analyse de la variation de la structure entre le début et la fin de la procédure de minimisation montre un RMSD inférieur à 1 (0,588), ce qui traduit un très faible changement de la structure de l'enzyme par rapport à la structure initiale, et donc un maintien de sa fonctionnalité.

Afin d'équilibrer le système optimisé et de générer un modèle robuste d'acyl-enzyme destiné à être utilisé comme cible de docking, une dynamique moléculaire a été réalisée à 300 K, pendant 1 ns. L'évolution de l'énergie totale du système au cours du temps a été suivie. La figure 3.9 montre une stabilisation de l'énergie totale et de la température du système après un temps de simulation de 50 ps.

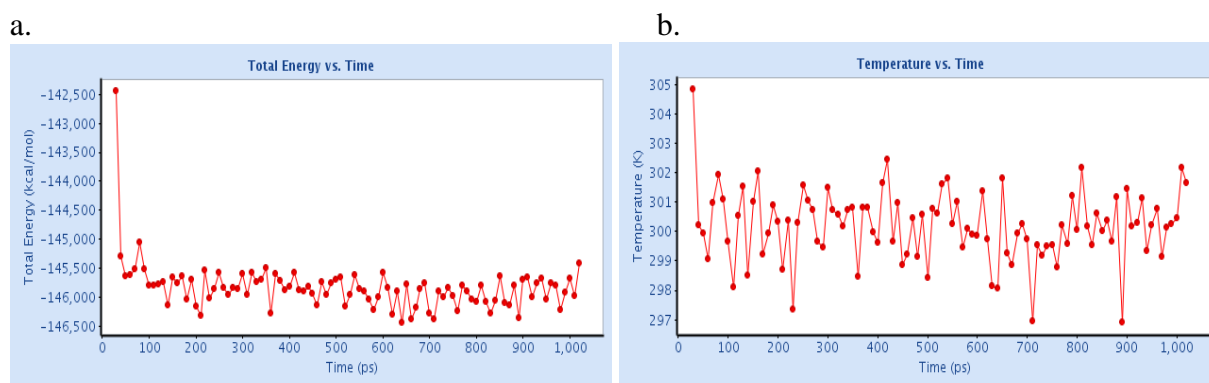


Figure 3.9 : suivi de l'évolution de l'énergie totale du système (a) et de la température (b) au cours de la dynamique moléculaire

Cette simulation de dynamique moléculaire a permis de générer une centaine de conformations, parmi lesquelles un modèle devait être choisi pour être utilisé dans les simulations de docking ultérieures. La sélection de ce modèle s'est basée sur le respect de critères de distance permettant un positionnement et une stabilisation corrects de l'acyl-enzyme au niveau du trou oxyanion (Ferrari et al., 2014a). A cet effet, des distances entre l'oxygène oxyanion de l'acyl-enzyme et les fonctions amide et hydroxyle de la Thr40 ainsi qu'avec la fonction amide de la Gln106, inférieures à 3 Å sont nécessaires, afin de permettre l'établissement de liaisons hydrogène. Sur les 100 conformations de la trajectoire, la grande majorité d'entre elles (71 configurations) respectent uniquement 2 des critères de distances précités, tandis que 8 conformations respectent tous les critères (figure 3.10).

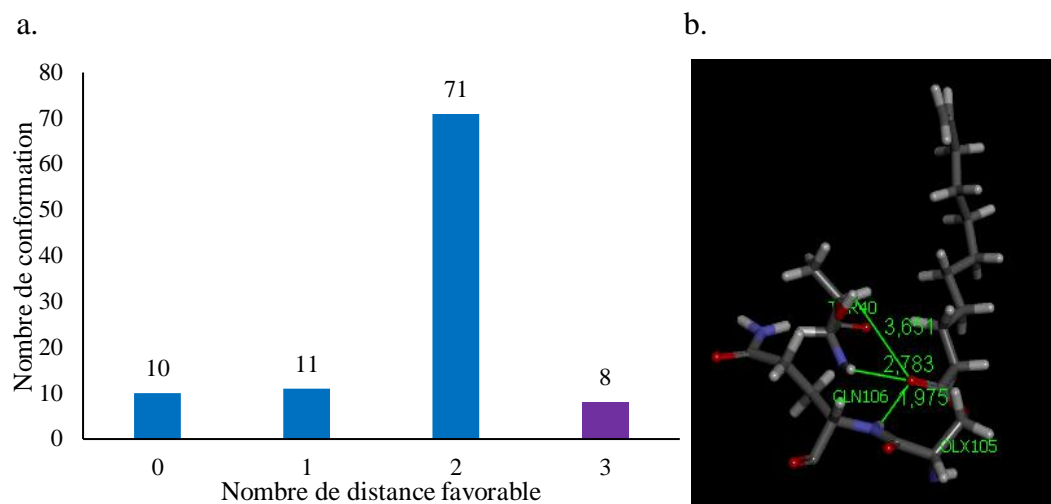


Figure 3.10 : distribution des cibles générées au cours de la trajectoire de dynamique moléculaire selon le nombre de critères de distance respectés au sein du trou oxyanion (a) ; un exemple de conformation respectant l'ensemble des critères de distance assurant un positionnement et une stabilisation corrects de l'acyl-enzyme (b)

En plus de ces critères de distance, l'accessibilité au site actif durant les simulations de docking doit également être prise en compte. Ainsi, les conformations dans lesquelles un repliement de la chaîne grasse limiterait l'insertion des ligands dans le site catalytique ne peuvent être choisies comme cibles de docking. Une évaluation du positionnement de l'extrémité de la chaîne grasse a donc été réalisée. Pour cela, l'accessibilité des molécules d'eau au site actif a été évaluée visuellement, celle-ci laissant présager une bonne accessibilité des ligands au cours des simulations de docking (formation d'un tunnel d'eau) (figure 3.11). Parmi les 8 configurations précédemment sélectionnées seulement 4 présentent une bonne accessibilité des molécules d'eau au site actif, la chaîne grasse de l'acyl-enzyme interagissant étroitement avec la paroi de la cavité catalytique ; l'une d'elles a été choisie comme cible de docking pour les simulations ultérieures. Pour les autres conformations, l'accès au site actif est limité ; celles-ci ont donc été rejetées.

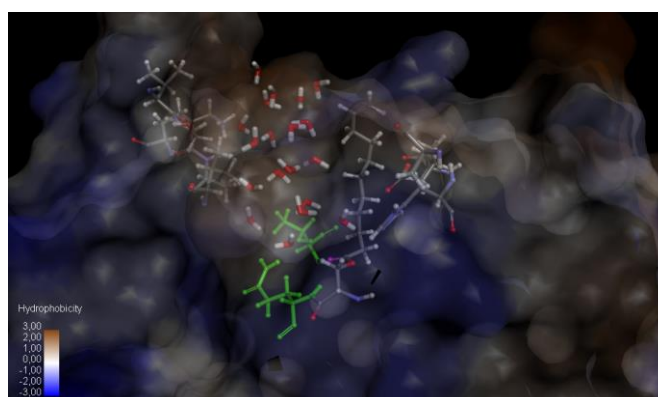


Figure 3.11 : exemple d'une conformation de l'acyl-enzyme présentant une bonne accessibilité des molécules d'eau aux résidus catalytiques

### 3.6.2.2 Etude des modes d'interaction entre les acides aminés et l'acyl-enzyme C11'-CALB

Des simulations de docking moléculaire ont permis d'étudier les interactions entre divers acides aminés accepteurs d'acyle et l'acyl-enzyme C11'-CALB. Le modèle d'acyl-enzyme précédemment sélectionné a été utilisé comme cible de docking après avoir supprimé les molécules d'eau présentes dans la cavité catalytique. Huit acides aminés portant des groupements fonctionnels (lysine, arginine, histidine, cystéine, acide aspartique, sérine, asparagine, tyrosine) ont été sélectionnés afin d'évaluer la régio- et chimio-sélectivité de CALB au cours de la réaction d'acylation par l'acide undécénoïque. Par ailleurs, sept autres acides aminés ont été choisis afin d'évaluer l'influence de la longueur et la structure de la chaîne latérale (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phénylalanine). Les résultats dans la figure 3.12, montrent que dans le cas des acides aminés non polaires aliphatiques, il y a une claire influence de la longueur de la chaîne latérale sur le nombre de poses générées au cours des simulations de docking. En effet, l'augmentation de la longueur de la chaîne latérale s'accompagne d'une augmentation du nombre de poses générées jusqu'à un certain niveau (leucine > valine > alanine > glycine). Ceci peut être expliqué par l'instabilité des ligands de petites tailles tels que la glycine à l'intérieur de la cavité catalytique de CALB lors de l'échantillonnage de l'espace conformationnel. Ceci a aussi été observé par Dettori (2017) qui a démontré qu'une augmentation de la taille de la glycine par greffage de groupements tels que le radical *tert*-butyle permettait d'améliorer les interactions avec l'enzyme. Pour les autres acides aminés, les nombres de poses générées sont similaires.

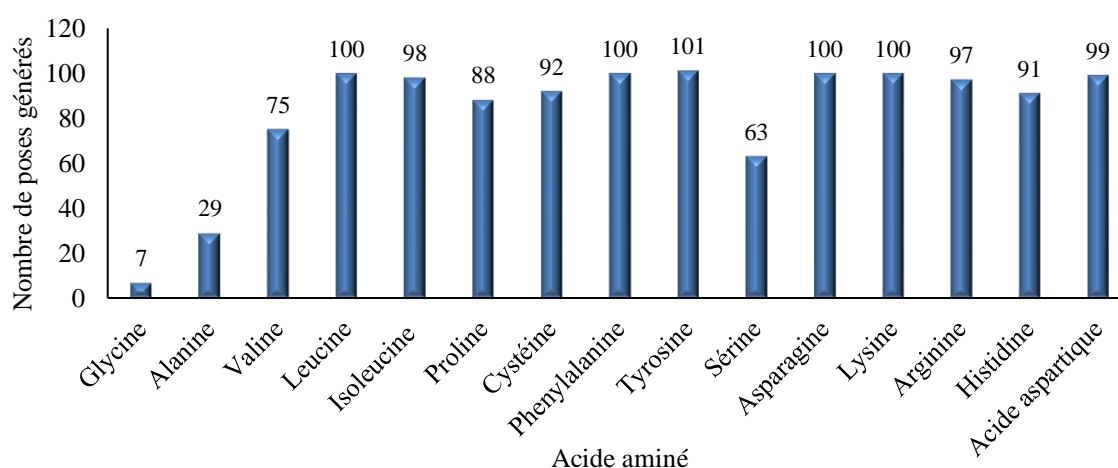


Figure 3.12 : Nombre de poses générées au cours des simulations de docking moléculaire de différents acides aminés sur la cible C11'-CALB

Les poses générées au cours des simulations de docking ont été analysées en termes de localisation des acides aminés au niveau de la cavité et de proximité aux résidus catalytiques



évaluée selon les critères de distances présentés en section 5.1 de ce chapitre. On rappelle que les poses susceptibles de conduire à la formation d'un produit doivent présenter une distance entre le groupement nucléophile de l'accepteur d'acyle (fonction amine dans notre cas) et la fonction carbonyle de l'acyl-enzyme inférieure à 4 Å, afin de favoriser une attaque nucléophile. La même contrainte a été appliquée à la distance entre l'His224 qui participe au transfert de proton pendant l'attaque nucléophile et le groupement nucléophile du donneur d'acyle, ainsi qu'à la distance entre l'amine secondaire de l'His224 et la chaîne latérale de la Ser105 (Bidouil, et al., 2011 ; Ferrari et al., 2014a).

La distribution des poses générées au cours du docking montre une répartition en deux clusters, selon que l'acide aminé est localisé à l'entrée de la cavité catalytique ou au fond de la cavité à proximité des résidus catalytiques (figure 3.13). L'analyse des interactions au niveau des ligands positionnés à l'entrée de la cavité montre une grande similitude entre les différents acides aminés dockés. En effet, les ligands positionnés à l'entrée de la cavité établissent des interactions hydrophobes avec les résidus Ala141, Val154, Trp155 et Leu144. Des liaisons hydrogène avec les résidus Ser150, Asp145, Thr158 et Leu140 peuvent aussi intervenir dans la stabilisation des ligands à l'entrée de la cavité.

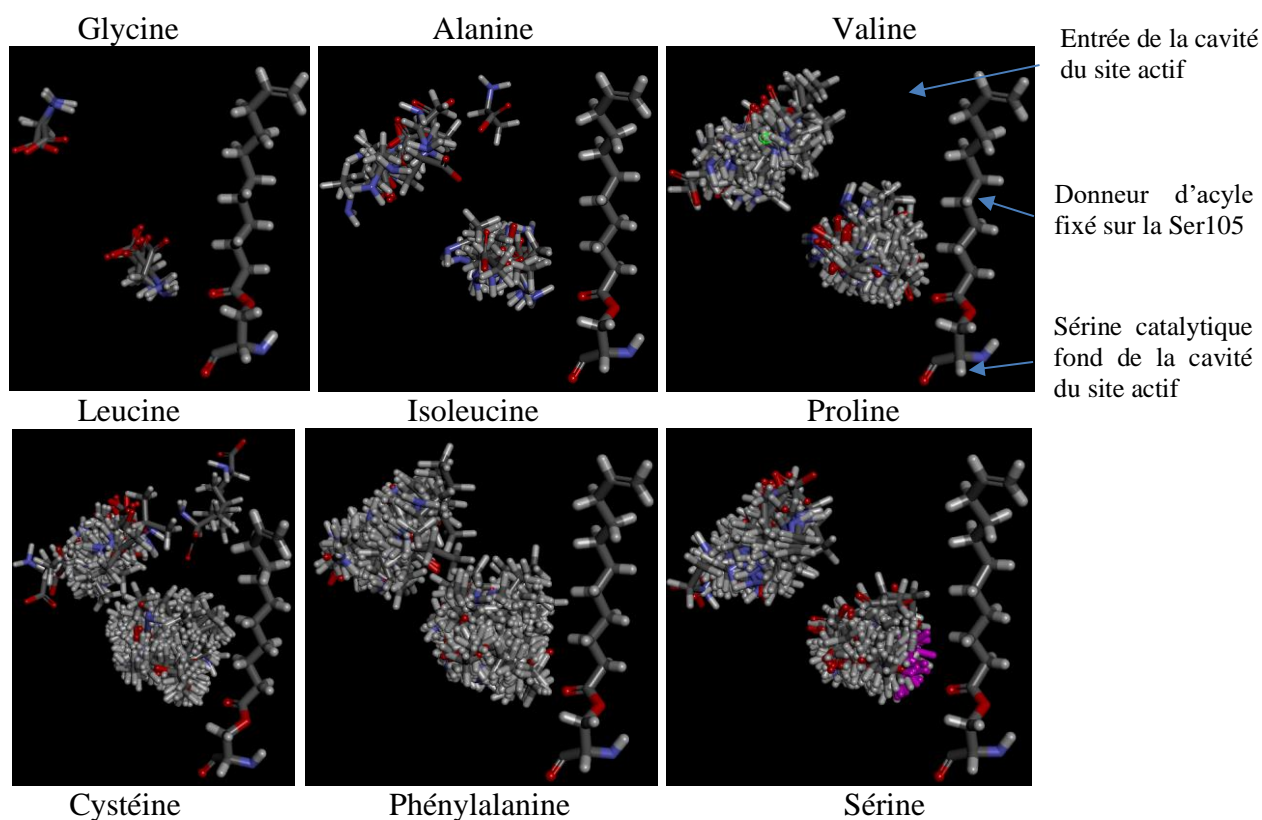


Figure 3.13 : localisation des ligands au sein des poses générées au cours des simulations de docking de différents acides aminés dans la cible C11'-CALB.

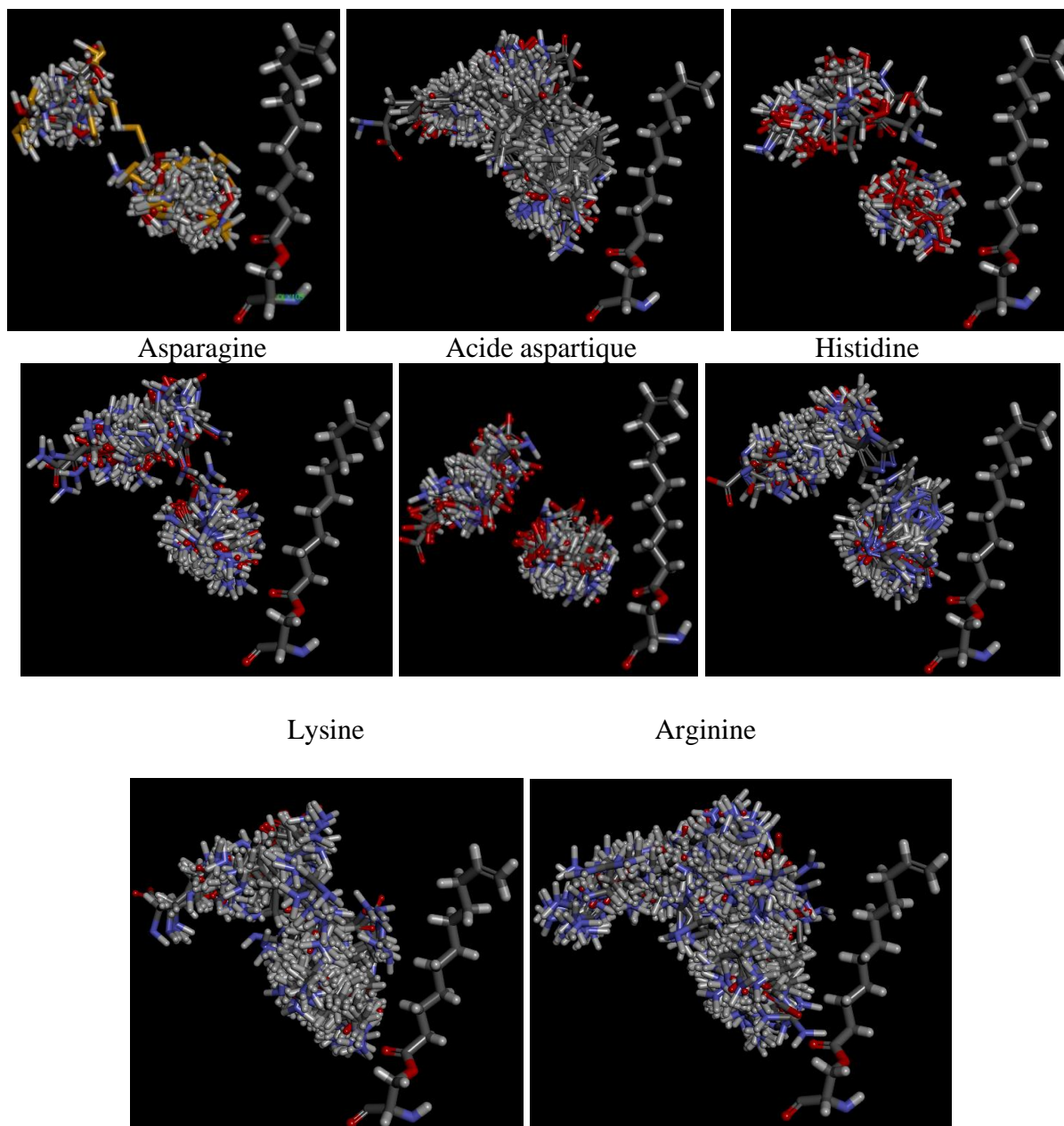


Figure 3.13 (suite) : localisation des ligands au sein des poses générées au cours des simulations de docking de différents acides aminés dans la cible C11'-CALB.

Le scoring des poses selon la somme des énergies d'interaction, classe les poses présentant les ligands à l'entrée de la cavité du site actif principalement à la fin du classement, traduisant une faible probabilité d'apparition, sauf dans le cas de l'arginine et de la phénylalanine. Dans le cas de l'arginine, la présence du groupement guanidine permet l'établissement de liaisons hydrogène avec les résidus de l'entrée de la cavité du site actif ; par ailleurs, dans certaines poses, des interactions électrostatiques avec des résidus acides (Asp145 et Glu294) (figure 3.14.a) sont observées. La présence du groupement aromatique de la phénylalanine permet l'établissement d'interactions hydrophobes avec les résidus hydrophobes présents à l'entrée de

la cavité en particulier les résidus Leu140, Ala141, Leu144, et Val154. Tout ceci conduit à une stabilisation des ligands à l'entrée de la cavité ce qui peut engendrer des problèmes de transfert du substrat acide aminé vers la triade catalytique (figure 3.14.b). Ces résultats sont similaires à ceux observés en présence de l'acide oléique comme donneur d'acyle (chapitre 3.a section 5.1).

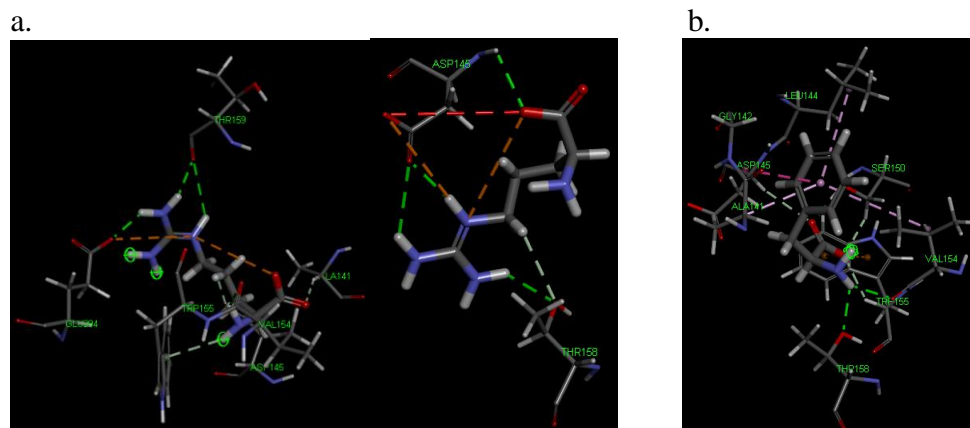


Figure 3.14 : interactions observées entre l'arginine (a), ou la phénylalanine (b) et les résidus de l'entrée de la cavité catalytique (--- et --- interactions hydrogènes, --- interactions hydrophobes, --- interactions électrostatiques)

Les poses présentant des ligands au fond de la cavité de l'enzyme ont été analysées suivant les critères de distances décrits précédemment. L'occurrence des poses qualifiées de favorables à la réaction est exprimée en pourcentage ; elle est donnée dans la figure 3.15.

Dans le cas des acides aminés possédant une chaîne latérale potentiellement acylable (lysine, tyrosine, cystéine, asparagine, arginine et histidine), un faible nombre de poses respectant les critères de distance a été observé (15% maximum de poses favorables à une acylation sur l'ensemble des poses générées pour chaque acide aminé). Ce faible taux pourrait être lié à l'établissement de liaisons hydrogène entre le groupement amine du ligand et certains résidus tels que Gln157 et Asp134 ainsi qu'entre le groupement carboxyle de l'acide aminé et la Val154, ce qui peut éloigner le ligand de la sérine catalytique. Par ailleurs, les poses présentant les fonctions amines de la chaîne principale de l'alanine et de l'acide aspartique ainsi que la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine à proximité du fond de la cavité figurent en tête de classement des poses (cinq premières positions). Cela suggère une probabilité importante d'acylation de ces groupements par CALB. Toutefois, ces résultats sont en contradiction avec les données expérimentales. En effet, l'évaluation de l'acylation des acides aminés par CALB en solvant organique et autres milieux non-conventionnels n'a pas permis de détecter l'apparition de produits acylés, sauf dans le cas de la lysine qui est acylée au niveau du groupement amine de sa chaîne latérale. Les divergences observées entre les données issues des modèles et les données expérimentales peuvent s'expliquer par les nécessaires simplifications

admises lors de la construction des modèles ainsi que par le caractère qualitatif et peu quantitatif de l'analyse des modèles. Plus spécifiquement, certains aspects entrant en jeu lors de la réaction d'acylation comme la réactivité chimique des complexes enzyme/substrats, la solubilité des substrats ou encore le transfert des substrats ne sont pas pris en compte dans les modèles, ce qui peut fragiliser la capacité des modèles à prédire la faisabilité des réactions.

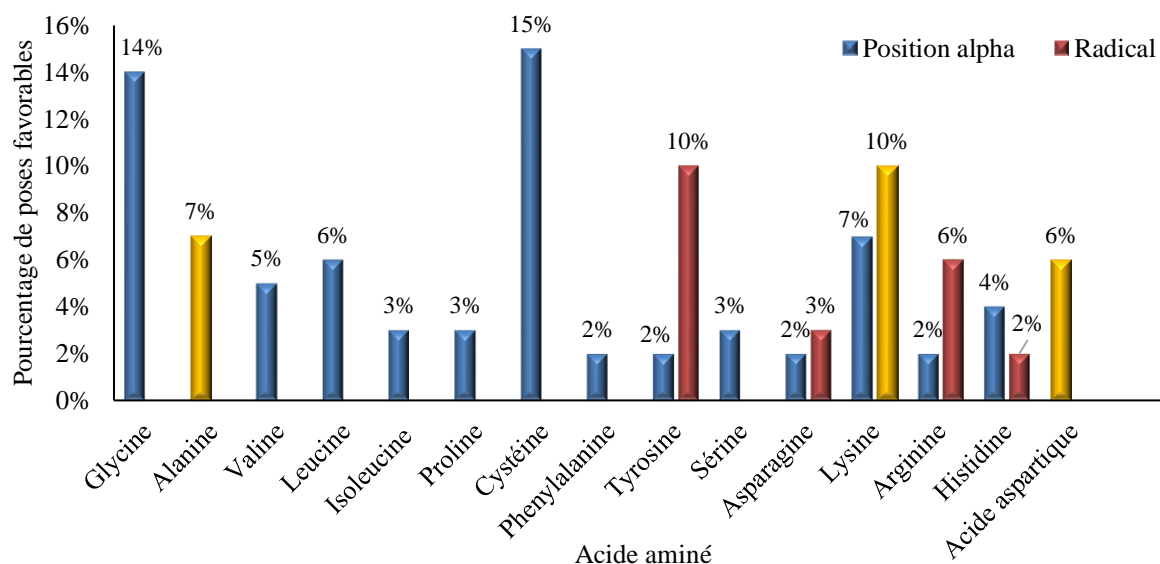


Figure 3.15 : pourcentage des poses respectant les critères de distance soit avec la fonction amine de la chaîne principale, soit avec le groupement nucléophile de la chaîne latérale de l'acide aminé (histogrammes en jaune : ligands classés en premier suite au scoring)

### 3.7 Conclusions

L'objectif principal de ce chapitre était l'évaluation des performances des lipases pour la réaction d'acylation des acides aminés en solvants non conventionnels en particulier verts (scCO<sub>2</sub> et solvants eutectiques profonds). La lipase B de *Candida antarctica* a été utilisée lors de cette étude sur la base des données de la littérature qui ont montré que cette dernière présentait des performances qui semblaient être adaptées à la réaction cible. Plusieurs solvants réactionnels ont été utilisés pour la réaction d'acylation des acides aminés en particulier la phénylalanine avec l'acide undécénoïque qui présente un intérêt industriel. Cependant, tous les résultats ont montré de faibles performances de cette enzyme pour la réaction de N-acylation des acides aminés (récapitulatif dans le tableau 3.5). Plusieurs facteurs ont été mis en cause pour expliquer ces résultats selon le solvant réactionnel utilisé. En effet, le caractère hydrophile des acides aminés constitue une limitation majeure lorsque la réaction est réalisée dans des milieux apolaires tels que les solvants organiques et le scCO<sub>2</sub>, engendrant la précipitation de ces derniers et ainsi un faible transfert de matière. Le problème de transfert du substrat peut aussi être lié aux caractéristiques du solvant qui peut présenter une viscosité importante, comme

c'est le cas pour les solvants eutectiques profonds. L'utilisation de l'enzyme libre a permis d'atténuer ce problème mais l'apparition de produits secondaires par interaction de l'acide aminé avec le solvant réactionnel réduit considérablement la quantité de substrat disponible pour la réaction, ce qui modifie l'équilibre réactionnel. L'utilisation de milieux biphasiques peut aussi être envisagée afin de solubiliser les deux substrats par l'utilisation soit de deux solvants organiques non-miscibles, soit du substrat donneur d'acyle en excès. Toutefois, ces conditions n'ont pas permis d'améliorer les résultats. Suite à ces résultats, une étude *in silico* s'est imposée afin de vérifier l'adéquation de CALB pour catalyser l'acylation des acides aminés. Les résultats issus des modèles suggèrent une faible probabilité de N- $\alpha$ -acylation des acides aminés avec l'acide undécénoïque, sauf dans le cas de l'alanine et de l'acide aspartique. Ces observations ne sont pas en accord avec les résultats expérimentaux qui ont montré l'absence d'acylation de ces acides aminés. Par ailleurs, les simulations de docking ont suggéré la possibilité d'acyler la chaîne latérale de la lysine ce qui est cohérent avec les résultats expérimentaux obtenus. Le docking des autres acides aminés a montré l'existence de poses favorables d'un point de vue du positionnement de l'acide aminé dans la cavité catalytique, mais peu favorables sur le plan énergétique. Les modes d'interactions des acides aminés avec l'acyl-enzyme se justifient principalement par des interactions de type liaison hydrogène et/ou des interactions hydrophobes avec des résidus localisés à l'entrée du site actif (Ala141, Leu140, Ala141, Leu144, et Val154) ou avec des résidus proches de la triade catalytique (Gln157 et Asp134). Ces résultats préliminaires sont intéressants car ils fournissent des premiers éléments de compréhension de la sélectivité enzymatique mais ne nous permettent pas de confirmer avec certitude l'inadéquation de CALB à catalyser ce genre de réaction. Il sera donc important de compléter ces premiers résultats avec une étude *in silico* plus approfondie.

Au vu de ces résultats, la nécessité de trouver de nouveaux systèmes réactionnels apparaît comme un véritable enjeu scientifique. L'une des alternatives aux lipases est l'utilisation d'enzymes capables de catalyser les réactions d'acylation en milieux aqueux permettant une bonne solubilisation des acides aminés : c'est le cas des acylases. Plusieurs auteurs ont décrit la mise en œuvre d'aminacylases en milieu aqueux tamponné ou par addition de glycérol pour contrôler l'équilibre de la réaction d'acylation de différents acides aminés. Récemment, notre équipe a mis en évidence la capacité d'aminacylases de *Streptomyces ambofaciens* à catalyser la réaction d'acylation de certains peptides et de la lysine au niveau des fonctions amines des chaînes principales (Dettori et al., 2017). Cependant, la capacité de ces enzymes à catalyser la réaction d'acylation des acides aminés autres que la lysine n'a pas encore été décrite. A cet

### Chapitre III : Performances des lipases pour la réaction d'acylation des acides aminés

effet, le chapitre suivant traitera de l'évaluation des performances de ces biocatalyseurs originaux pour la réaction d'acylation des acides aminés.

Tableau 3-5 : Résumé des résultats expérimentaux obtenus avec les lipases en milieux non-conventionnels et hypothèses sur les phénomènes mis en jeu.

Milieu	Résultats	Hypothèses des phénomènes impliqués
Solvant organique (M2B2/TEA) (acylation des 20 acides aminés)	Pas d'acylation des acides aminés sauf pour la lysine sur l'amine de la chaîne latérale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible solubilité des acides aminés dans les solvants organiques</li> <li>- Absence de spécificité de CALB vis-à-vis des fonctions amine en position alpha</li> </ul>
CO <sub>2</sub> supercritique (acylation de la phénylalanine et de la glycine)	Traces de produit visibles en spectrométrie de masse	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Précipitation des acides aminés par effet antisolvant</li> <li>- Acidification du microenvironnement aqueux de l'enzyme par l'acide carbonique formé après dissolution du CO<sub>2</sub></li> <li>- Formation de carbamates avec les amines libres de la chaîne latérale des lysines présentes à la surface de l'enzyme</li> <li>- Formation de carbamate avec les amines libres des acides aminés utilisés comme substrat</li> </ul>
Solvants eutectiques profonds (acylation de la phénylalanine)	Choline chlorure / urée (1/2)	<p>Très faible quantité de produit d'acylation et apparition de plusieurs composés secondaires avec CALB immobilisée</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Importante viscosité → problème de transfert du substrat vers l'enzyme</li> <li>- Interaction entre la phénylalanine et l'urée</li> </ul>
	Choline chlorure / glycérol (1/2)	<p>Production de 0,56 g/L de C11'F et apparition de plusieurs composés secondaires avec CALB libre</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Interaction entre la phénylalanine et l'urée</li> </ul>
	Choline chlorure / glycérol (1/2)	<p>Absence d'acylation de la phénylalanine et absence d'apparition de composés secondaires en présence de CALB libre et immobilisée,</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pH acide du solvant (pH 4) → état d'ionisation des substrats non favorable à une acylation</li> </ul>
Tampon (tris pH8) / Décane ou acide gras	Aucune trace de produit en présence de CALB libre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence d'activation interfaciale de l'enzyme</li> <li>- Absence de spécificité de CALB vis-à-vis des fonctions amine alpha</li> </ul>

CHAPITRE IV : PERFORMANCES DES ACYLASES DE  
*STREPTOMYCES AMBOFACIENS* COMME CATALYSEURS DE LA  
RÉACTION D'ACYLATION ENZYMATIQUE DES ACIDES AMINÉS

---





## **4 Chapitre IV : Performances des acylases de *Streptomyces ambofaciens* comme catalyseurs de la réaction d'acylation enzymatique des acides aminés**

### **4.1 Introduction**

Suite aux faibles conversions observées lors de l'étude de l'acylation enzymatique des acides aminés par des lipases dans différents milieux réactionnels, la recherche d'autres catalyseurs capables de réaliser cette catalyse en milieu aqueux a été envisagée. Les premiers résultats de Dettori et al. 2017 ont démontré l'aptitude des aminoacylases de *Streptomyces ambofaciens* à réaliser l'acylation de la lysine et de différents peptides, sur l'amine en position alpha, en milieu aqueux contrairement à CALB qui présente une régiosélectivité en faveur de celle en position epsilon de la lysine. Dans un premier temps, la spécificité de substrat et la chimio-sélectivité des aminoacylases de *S. ambofaciens* ont donc été étudiées. L'influence de la concentration en substrat et du produit ainsi que l'effet d'activation par des ions métalliques sur l'activité enzymatique lors de la production de l' $\alpha$ -lauroyl-L-lysine ont également été étudiés. L'objectif global était donc d'estimer et de préciser les performances catalytiques des aminoacylases de *S. ambofaciens* lors de réactions d'acylation d'acides aminés. Dettori et al., 2017 ont démontré, chez cette bactérie, la présence de quatre aminoacylases. Les principales activités aminoacylases ont été attribués à Sam-ELA, spécifique à l'acylation en position epsilon de la lysine, et à Sam-AA, spécifique de l'acylation de la lysine en position alpha. Les activités de synthèse des 2 autres aminoacylases, Sam-PVA et Sam-AA like, étaient minoritaires. Dans le but de réaliser l'acylation des acides aminés en position alpha, deux stratégies ont été suivies afin de produire et de caractériser Sam-AA séparément.

La première stratégie pour étudier Sam-AA a consisté à envisager la production hétérologue de cette dernière, ainsi que de Sam-ELA et de Sam-PVA, chez *E. coli*. La deuxième stratégie a été d'étudier la spécificité de substrat et la chimio-sélectivité des aminoacylases présentes dans un extrait brut d'une culture d'une souche de *S. ambofaciens* chez laquelle les gènes codant pour Sam-PVA et Sam-ELA ont été délétés, exprimant ainsi principalement Sam-AA. Les caractéristiques mises en évidence chez cette souche mutante ont ensuite été comparées aux performances des aminoacylases présentes dans un extrait brut de *S. ambofaciens* sauvage.

### **4.2 Evaluation des performances catalytiques des aminoacylases de *S. ambofaciens* pour l'acylation d'acides aminés**

La réaction de N-acylation enzymatique des acides aminés a été peu décrite dans la littérature. Plusieurs enzymes ont été décrites comme capables de catalyser l'acylation d'acides

## Chapitre IV : Performances des acylases pour la réaction d'acylation des acides aminés

aminés avec des acides gras en milieu aqueux. Différentes enzymes produites par des micro-organismes tels que les bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces* ont été décrites dans plusieurs études. Ainsi, Koreishi et al, ont pu identifier la présence de plusieurs aminoacylases capables de réaliser l'acylation de différents acides aminés dans des surnageants de culture de *Streptomyces mobaraensis* (Zhang et al., 2007 ; Koreishi et al., 2005a ; 2007a ; 2006a ; 2005ba ; 2009a). En 2018, Dettori et al. ont identifié la présence d' aminoacylases produites par *S. ambofaciens* dont les gènes codant ces enzymes étaient très similaires à ceux des enzymes codant pour les aminoacylases décrites par Koreishi et al avec 86, 80 et 69% d'identité de séquence entre Sm-AA, Sm-ELA et Sm-PVA et Sam-AA, Sam-ELA et Sam-PVA respectivement.

Le présent travail a donc pour but d'évaluer les performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* ATCC23877 en termes de chimio- et régiosélectivité ainsi que d'étudier l'influence de certains paramètres réactionnels sur les performances catalytiques de ces enzymes.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'une publication publiée dans le journal « Enzyme and microbial technology » (Bourkaib et al., 2020).



Contents lists available at ScienceDirect

Enzyme and Microbial Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/enzmictec](http://www.elsevier.com/locate/enzmictec)

## N-acylation of L-amino acids in aqueous media: Evaluation of the catalytic performances of *Streptomyces ambofaciens* aminoacylases



Mohamed Chafik Bourkaib<sup>a</sup>, Stephane Delaunay<sup>a</sup>, Xavier Framboisier<sup>a</sup>, Laurence Hôtel<sup>b</sup>, Bertrand Aigle<sup>b</sup>, Catherine Humeau<sup>a</sup>, Yann Guiavarc'h<sup>a</sup>, Isabelle Chevalot<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> IRGP, UMR 7274 CNRS-Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, F-54518, VANDOEUVRE CEDEX, France

<sup>b</sup> Université de Lorraine, INRA, DymAMic, Nancy, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Biocatalysis  
Aminoacylases  
*Streptomyces ambofaciens*  
Amino-Acid-Based  
Surfactant  
Selectivity  
Enzymatic N-acylation

### ABSTRACT

N-acylated amino acids are widely used as surfactants and/or actives in cosmetics and household formulations. Their industrial production is based on the use of the Schotten-Baumann chemical and unselective reaction. Faced to the growing demand for greener production processes, selective enzymatic synthesis in more environment-friendly conditions starts to be considered as a potential alternative. This study concerns the use of the aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* to selectively catalyse aminoacid acylation reaction by fatty acids in aqueous medium. The results demonstrated that, when using undecylenoic acid as acyl donor, these aminoacylases properly catalyse the acylation of 14 of the 20 proteogenic L-amino acids tested on their  $\alpha$  amino group with a great variability depending on the nature of the amino acid (polar or not, positively/negatively charged, aromatic or not...). More precisely, the following 9 amino acids were shown to be preferentially acylated by *S. ambofaciens* aminoacylases as follows: lysine > arginine > leucine > methionine > phenylalanine > valine > cysteine > isoleucine > threonine. Different fatty acids were used as acyl donors and, in most cases, the fatty acid length influenced the conversion yield. The kinetic study of  $\alpha$ -lauroyl-lysine synthesis showed a positive influence of lysine concentration with  $V_{max}$  and  $K_m$  of 3.7 mM/h and 76 mM, respectively. Besides, the lauric acid had an inhibitory effect on the reaction with  $K_i$  of 70 mM. The addition of cobalt to the reaction medium led to a more than six-fold increase of the reaction rate. These results, achieved with the aminoacylases from *S. ambofaciens* represent an improved enzyme-based N-acylated amino acids production in order to provide an alternative way to the Schotten-Baumann chemical reaction currently used in the industry.

### 1. Introduction

Amino acid surfactants (AAS) are one of the most important class of natural surface-active molecules [1]. They come from the condensation of an amino acid as acyl acceptor, and one or more non polar molecules such as long chain fatty acids as acyl donors to constitute amphiphilic molecules with high surface activity. This characteristic, in addition to their eco-compatibility, makes them molecules of choice for food, pharmaceutical and cosmetic industries [2]. Given the structural diversity of the 20 natural amino acids and the great variety of fatty acids that can be involved in acylation reaction, a wide range of surfactants with diverse properties and activities can be found. Indeed, depending on the amino acid radical and the acylated group (O-acylation or N-acylation), AAS can be classified on the basis of head group type with different commercial applications. For instance, cationic AAS like

cocoyl arginine ethyl ester were described as disinfectants, antimicrobial agents and antistatic agents. Anionic AAS like N-cocoyl-L-glutamate and potassium N-cocoyl glycinate are used in cosmetics for several applications and non-ionic AAS for their good detergency and foaming properties (phenylalanine and leucine derivatives). Zwitterionic or amphoteric AAS like  $\epsilon$ -lauroyl-lysine, are widely used in creams and hair conditioners because of their low solubility in aqueous media [3,4]. The N-acylation position in the case of lysine as an acyl acceptor plays an important role in the property and activity of the synthesized AAS. Pérez et al. (2009) studied the influence of the N-acylated group of the lysine methyl and ethyl-ester on the antimicrobial activity [5]. They demonstrated that the N-acylation on  $\epsilon$ -position decreased considerably the antimicrobial activity as compared to what was observed when acylation occurred in  $\alpha$ -position. This was due to the important difference in pKa between amino groups. These pKa are of 8.8 and 6.2 for

\* Corresponding author.

E-mail address: [Isabelle.Chevalot@univ-lorraine.fr](mailto:Isabelle.Chevalot@univ-lorraine.fr) (I. Chevalot).

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109536>

Received 17 December 2019; Received in revised form 14 February 2020; Accepted 22 February 2020

Available online 24 February 2020

0141-0229/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

the amino group in position  $\epsilon$  and  $\alpha$ , respectively. They also reported that the hemolytic activity of N- $\alpha$ -acyl lysine based surfactant was lower than the N- $\epsilon$ -acyl lysine one, but both had much lower activity as compared to the classical cationic quaternary ammonium surfactants like alkyltrimethylammonium salts [5,6]. These results showed the practical interest of N- $\alpha$ -acylation of amino acids and consequently, of a regioselective acylation when using an amino acid such as lysine, with two different amino groups.

The most common way to produce those AAS is via the Schotten-Baumann chemical reaction where the amino acid reacts with a fatty acid chloride under highly alkaline condition by using NaOH or Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in TFA/water or by using solvents like trimethylamine or N-methylmorpholine. In addition, the N-acylation of amino acids exhibiting functional groups at their side chain requires a preliminary step of protection in order to avoid side reactions [7]. Even if this chemical way presents high synthesis yields, the production at industrial scale leads to large volumes of effluents requiring a very expensive reprocessing step. Nowadays, more and more industries try to develop sustainable technologies by switching from waste remediation and pollution control by end-of-pipe solution to waste prevention, reducing the environmental issues and the reprocessing cost [8]. One of the most interesting way to meet these aims is the use of biologically mediated reactions, more generally called bioconversions. Enzymes are catalysts of choice for such reactions to avoid the formation of by-products and salts. They can make the catalysis in mild conditions (pH and temperature), are relatively substrate specific and often show chemo-, regio- and even enantioselectivity. To date, while many articles and books have been dealing with O-acylation (esterification or transesterification), mainly using lipases, only few studies have been focused on the N-acylation reaction. Few authors have evaluated the performances of enzymes for the acylation of amino acids using even free fatty acids or triglycerides like soybean and palm oil [9–15]. Lipases, especially *Candida antarctica* lipase B (CALB), *Rhizomucor miehei* lipase, and proteases are the most used biocatalysts. They are hydrolases that can perform synthesis reaction in non-aqueous media such as organic solvents or in solvent free condition in order to shift the thermodynamic equilibrium towards the synthesis. However, amino acids are poorly soluble in organic solvents [14,16,17]. Attempting to solve this problem, several authors used amino acid derivatives using Cbz (carboxybenzyle) or tert-butyl ester in order to improve their solubility and to protect the carboxylic part, allowing an increase of the conversion rate [17–19]. But this method needs an additional chemical step of deprotection to give the final product [19]. Other authors used ionic liquids in order to improve the solubility of the acyl acceptor. Husson et al., 2009 were able to improve the reaction performance of CALB for the synthesis of N- $\epsilon$ -oleyl lysyl-serine by using 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim]<sup>+</sup> [PF6]<sup>-</sup>) instead of 2-methyl-2-butanol as reaction medium (initial rate was found to increase from 1 to 32 mM/h) [20]. However, the large scale use of neoteric media such as ionic liquids tends to be limited by several key drawbacks: their high viscosity, the complexity of their production but also their price as well as a lack of information on their toxicity [21]. As a catalytic alternative to lipases in anhydrous or almost anhydrous solvents, the use of aminoacylases obviously presents one key advantage: they can perform N-acylation in water while being present in a wide variety of biological matrices [22,23]. Only few studies investigated N-acylation of amino acids in aqueous media. Acylases produced by microorganisms were among the most used enzymes at industrial scale for the production of biomolecules. Microbial enzymes performing the amino acids amidation in aqueous or organic-aqueous medium were described by Koreishi et al., [10,11,24,25]. Four acylases from *Streptomyces mobaraensis* were identified and three of them were characterized for the N-amino acid acylation reaction. The first one is a monomeric aminoacylase metallo-enzyme of 100 kDa. This enzyme was able to catalyse the N-acylation of almost all the amino acids with much less specificity for glycine, cysteine, aspartic acid and histidine and no reaction with tyrosine and

proline using 10 mM of ferulic acid as acyl donor in 70 % glycerol reaction media. The production of N- $\alpha$ -feruloyl-L-lysine was improved by using 100 mM tris HCl buffer (pH 7.5) without glycerol at optimum conditions [24]. The second enzyme was the  $\epsilon$ -Lysine acylase (Sm-ELA) which was identified as a monomeric metallo-enzyme of around 60 kDa. This enzyme showed a regioselectivity towards the N-acylation of the lysine side chain ( $\epsilon$ -position). It efficiently catalysed the N- $\epsilon$ -acylation of lysine with fatty and aromatic acyl groups in aqueous buffer [9,10]. The third acylase (Sm-PVA) was a dimeric enzyme of 61 and 19 kDa identified as belonging to the Penicillin V acylase family. This latter was able to catalyse the N-acylation reaction of several amino acids with lauric acid showing a better activity with lysine in  $\epsilon$ -position, arginine and cysteine [11,26]. The last acylase (Sm-AA) was a monomeric protein of 55 kDa belonging to the peptidase M20 family. This enzyme showed efficient hydrolytic activity towards amino acids acylated with short or long chain fatty acids [25]. Recently, Dettori et al. (2017) described the ability of a crude extract from *S. mobaraensis* ATCC23877 to perform the N-acylation of lysine and peptides with oleic acid on their  $\alpha$  position unlike the CALB. By blast analysis, and using the genes encoding Sm-AA, Sm-ELA and Sm-PVA from *S. mobaraensis* as baits, 3 genes encoding putative acylases and sharing 86, 80 and 69 % identity, respectively, were identified in the genome of *S. mobaraensis*. Another gene, presenting 55 % identity with the sequence of Sm-AA was also identified. By gene deletions, and just keeping Sam-AA or Sam-ELA genes, it was shown that Sam-ELA enzyme showed hydrolytic specificity for N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine and that Sam-AA enzyme had specificity towards N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine, while the crude extract was unspecific. By generating a mutant without Sam-ELA and Sam-AA genes, it was also demonstrated that 85 % of the N-acylation ability from the crude extract was due to Sam AA and Sam-ELA [12]. The activity of these acylases from *S. mobaraensis* ATCC23877 was also evaluated for the synthesis of lauroyl-lysine after enzyme immobilisation [27]. However, to date, no data has been reported regarding the substrate specificity (acyl donor and acyl acceptor) of the acylases from *S. mobaraensis* ATCC23877.

The aim of this study was therefore to determine the substrate specificity of the aminoacylases from *S. mobaraensis* for the acylation reaction of the twenty proteinogenic amino acids with middle and long chain fatty acids. The influence of the operational conditions on reaction performances was also investigated using lauroyl lysine synthesis as a reference reaction.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Aminoacylases of *S. mobaraensis* production

In order to have enough *S. mobaraensis* ATCC23877 spores before starting the culture steps, a sporulation step was performed. The strains spores stored as suspensions at  $-80^{\circ}\text{C}$  were streaked on Soy Flour Mannitol agar (SFM) filled. This later contain 20 g/L Mannitol, 20 g/L precooked Soy flour (Celnat) and 20 g/L Agar. After minimum 7 days of culture at  $28^{\circ}\text{C}$ , the spores of *S. mobaraensis* were collected by adding 2 mL of 20 % (v/v) glycerol and by scratching the mycelium with a sterile handle before freezing the spore suspension at  $-20^{\circ}\text{C}$ . In the same way the spores of *S. mobaraensis*  $\Delta\text{SAM23877}_1485::\text{scar}\Delta\text{SAM23877}_0977::\text{scar}$  strain was prepared. This strain was obtained by deletion of  $\Delta\text{SAM23877}_1485$  and  $\Delta\text{SAM23877}_0977$  genes coding for Sam-ELA and Sam-PVA respectively as described in [12]. The culture was done in 3 steps: germination, preculture and the culture. The first step was performed in the ICS medium (Insoluble complex medium). This medium contained sucrose 15 g/L, corn steep 5 g/L sterilized beforehand, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, NaCl 3 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L and CaCO<sub>3</sub> 0.2 g/L. The medium was then sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min. In a 250 mL baffled Erlenmeyer flask, 40 mL of this medium was inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of spore suspension. After the germination, 20 mL of ICS medium were

transferred in 200 mL of pre-culture medium contained in 2 L Erlenmeyer flask for the pre-culture step. The preculture medium composition was: Glucose 10 g/L, white dextrin 10 g/L, yeast extract 5 g/L, casein hydrolysate 5 g/L, and CaCO<sub>2</sub> 1 g/L. The pH of the preculture medium was set at 6.5 before sterilization at 121 °C for 20 min. The two first steps were performed for 48 h at 28 °C and 250 rpm orbital agitation using an INFORS AG AK 82 agitator. 30 ml of the preculture were then added in 950 ml of culture medium in 5 L Erlenmeyer flask for incubation. The culture was maintained for 7 days at 28 °C and 200 rpm orbital agitation using an INFORS HT Multitron agitator. The composition of the culture medium was meat extract 40 g/L, soluble starch 40 g/L, casein hydrolysate 20 g/L, MgSO<sub>4</sub> 20 g/L, and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L. The pH of the culture medium was set to 7 before sterilisation at 121 °C for 20 min. All the components of the culture media were purchased from Sigma-Aldrich, except sucrose and yeast extract, from Fluka, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (99 %), NaCl, CaCO<sub>3</sub> and acetonitrile, from Carlo Erba. At the end of the main culture, the bacterial cells were disrupted by first mixing the whole suspension for around 5 min minimum with an ULTRA-TURRAX T25 (Janke & Kunkel IKA Labortechnik) followed by 2 passages in a cell disrupter (Constant Cell disruption system, Cell-D) at 2 kbars. The cellular debris were removed by centrifugation at 8600 ×g at 4 °C for 20 min. Thereafter, the proteins including acylases were precipitated from the cell free extract by adding ammonium sulphate to the supernatant to 60 % of saturation and agitation was maintained for 1 h at room temperature. The precipitate was recovered by centrifugation at 8600 ×g at 4 °C for 20 min and was dissolved in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM, at pH 8. The solution was then diafiltered and concentrated using a Cogent µScale tangential flow filtration system equipped with a 10 kDa ultrafiltration membrane (Merck Millipore). Five dia-volumes were necessary for removing the salt. Salt removal was checked by following the conductivity evolution during the filtrations steps. The apparent specific activity of the *S. ambofaciens* crude extract was evaluated using lauroyl-lysine synthesis reaction. For this reaction lauric acid and L-lysine were used as substrates at equimolar concentration (0.1 M) in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM, at pH 8, 45 °C and at 500 rpm.

## 2.2. Enzyme assays

Substrate specificity of the acylases from *S. ambofaciens* toward acyl acceptor was evaluated by performing the condensation reaction of the 20 L-amino acids as acyl acceptors with 10-undecenoic acid as acyl donor. Reactions with taurine, 6-aminohexanoic acid, 6-amino-1-hexanol, ethanolamine, hydroxylamine, 4-amino-benzoic acid and carnosine as acyl acceptor and lauric acid as acyl donor were also performed. All acyl donors were from Sigma Aldrich except 4-amino-benzoic acid, which was from Merck.

Substrate specificity of the acylases from *S. ambofaciens* towards acyl donor was performed using lysine, arginine, methionine and phenylalanine with octanoic, 10-undecenoic, lauric and oleic acid as acyl donors. The influence of the acyl donor structure on the regioselectivity was evaluated using lysine as acyl acceptor and acetic, butyric, isobutyric, valeric, octanoic, phenylpropionic, benzoic and azelaic acid as acyl donors. All acyl donors were from sigma Aldrich except butyric acid and azelaic acid which were from Rectapur and Fluka Chemika, respectively. Substrate specificity evaluation was conducted in test tubes using 100 mM of each substrate in 2 mL of 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl buffer, at 45 °C, pH 8 and 250 rpm magnetic agitation. All reaction media were sonicated using an ultrasonic processor in order to improve reaction medium homogeneity.

The influence of substrate concentration was studied using lauroyl-lysine synthesis reaction. Concentrations from 25 to 250 mM of lysine or from 10 to 200 mM of lauric acid were used, the other substrate being fixed to 100 mM. The inhibition by the product of the reaction was investigated by adding different concentrations of a chemically produced α-lauroyl-lysine (from GeneCust, France, with 97.21 %

purity). The reaction was conducted in 1 mL reaction media containing 100 mM of both substrates.

The effect of metal ions was investigated using CoCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> (from Sigma Aldrich) and CuCl<sub>2</sub> (from Fluka Chemika). The reactions were performed in 3 mL of 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl buffer, at 45 °C, pH 8 and 500 rpm magnetic agitation.

In all cases, the reaction is started after one night agitation, in order to check if the reaction occurs without enzyme, by adding 1 g/L of the produced enzyme mixture from *S. ambofaciens*. At appropriate times, 50 or 100 µL aliquots of the reaction mixture were withdrawn and diluted with 80 % methanol for HPLC and LC-MS-MS analyses. For the regioselectivity evaluation, a TLC analysis was also performed. Finally, all reactions were stopped by freezing the mixture at -18 °C. Each reaction was performed at least twice.

## 2.3. Analytical methods

### 2.3.1. Qualitative analyses by TLC

Qualitative analyses of the reaction media by TLC were performed on Kieselgel G 60 Plates 20 cm × 20 cm (Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was: butanol (60 %)/acetic acid (20 %)/water (20 %) that permitted a slight but visible separation between the α and the ε monoacylated products. Knowing that lysine contains two amino groups allowed the detection by spraying a commercial solution of ninhydrin reagent (Sigma-Aldrich).

### 2.3.2. Quantitative analyses by HPLC

The quantification of reaction conversion yield was monitored using HPLC (LC 10 AD-VP, Shimadzu, France) equipped with a UV detector at 214 nm followed by a light-scattering low temperature evaporative detector (Shimadzu, France). Two columns were used: the first one was a C18 amide 125 × 2.1 mm (Altima\*, Altech, France) maintained at 25 °C. The mobile phase (0.2 mL/min flow rate) consisted of solvent A: methanol/water/TFA (60/40/0.1 v/v/v) and solvent B: methanol/TFA (100/0.07). A linear elution gradient was applied to reach 95 % methanol/TFA after 6 min. This methanol concentration was maintained for 13 min and then decreased in 1 min to reach the initial methanol/water ratio until the end of the run (35 min). However, the use of this column did not allow the separation of the product and the fatty acids when phenylalanine, leucine and isoleucine were used as acyl acceptors. In that cases a second column, Force Biphenyl 3 µm column 150 × 2.1 mm (Restek, USA), maintained at 35 °C, was used. The same mobile phase composition and gradient as before were used. Calibrations were performed using standard curve fatty acids and purified product in the case of α-lauroyl-lysine. The substrate conversion yield was determined using the following equation: conversion yield (%) = (1 - ([fatty acid]<sub>mol/L</sub>, consumed / [fatty acid]<sub>mol/L</sub>, initial)) × 100. Initial reaction rates were calculated using a third order polynomial model applied to the derivate of the first experimental data points exhibited in the figures. The maximum velocity (V<sub>max</sub>) and the Michaelis-Menten constant (K<sub>m</sub>) for each substrate were determined using a standard Michaelis-Menten model based on the equation of the graphic representing  $\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{S}\right) = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}$  where V is the initial rate and S is the substrate concentration. In the case of enzymatic substrate inhibition, inhibition constants (K<sub>i</sub>) and maximum velocity (V<sub>max</sub>) can be evaluated using  $V = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}}$  and by neglecting Michaelis Menten constant (K<sub>m</sub> is very low as compared to S). V<sub>max</sub> and K<sub>i</sub> were then determined according to the equation of the graphic representing  $\frac{1}{V} = f(S) = \frac{S}{K_i \cdot V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}$ .

### 2.3.3. Mass spectrometry analysis

Qualitative and semi quantitative analysis of the different acyl-amino acids were carried out on an HPLC-MS-MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a Linear

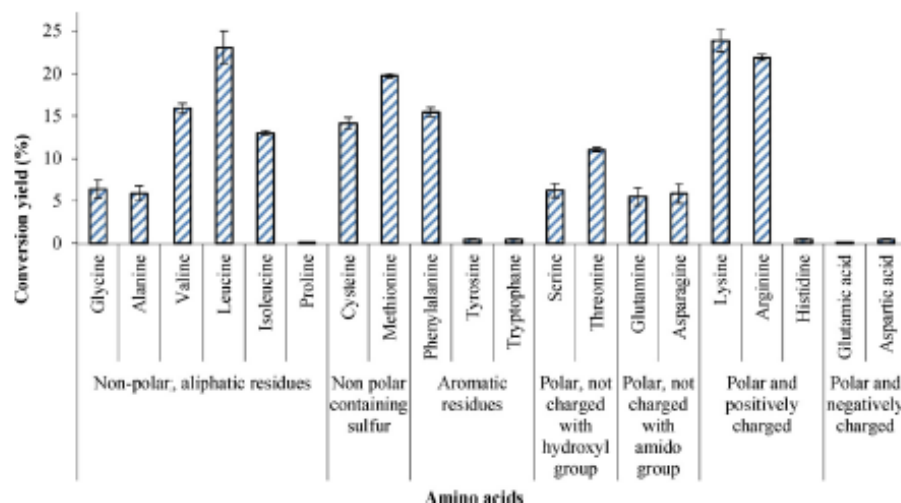


Fig. 1. Conversion yields for the synthesis reaction using various amino acids (100 mM) and 10-undecenoic acid (100 mM). Reaction conditions: 3 days, at 45 °C, 250 rpm agitation, in 25 mM Tris – HCl buffer, NaCl 50 mM, pH 8, using 1 g/L enzyme.

Trap Quadrupole mass spectrometer (LTQ). The system was equipped with an atmospheric pressure ionisation interface operating in positive electrospray mode (ESI+). Chromatographic separation was performed by injecting ten microliters of the prepared samples on a C18 Altima column (Grace/Alltech, Darmstadt, Germany, 150 mm × 2.1 mm, 5 μm porosity) equipped with a C18 pre-column (Grace/Alltech Darmstadt, Germany, 7.5 mm × 2.1 mm, 5 μm porosity) at 25 °C. The flow rate was set at 200 μL.min<sup>-1</sup> and mobile phases consisted of solvent A: methanol/water/TFA (80:20:0.1, v/v/v) when lauric or oleic acid was used and methanol/water (50:50, v/v) when shorter fatty acid was used and solvent B methanol/TFA (100:0.1, v/v). Acylated products were eluted using a linear gradient from 0 to 100 % of B for 5 min and then an isocratic step at 100 % of B for 10 min. Allure Biphenyl column 3 μm column 150-2.1 mm (Restek, USA), maintained at 35 °C, was used to perform the separation of the product and the fatty acid when using phenylalanine, leucine and isoleucine following the same gradient as with the C18 column. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at +4.5 kV; source gases were set for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 30, 10 and 10, respectively (in arbitrary units min<sup>-1</sup>); capillary temperature was set at 250 °C; capillary voltage was set at 48 V; tube lens, split lens and front lens voltages were set at 120 V, -34 V and -4.25 V, respectively. Ion optics parameters were optimized in ESI+ mode by automatic tuning using a standard solution of oleyllysine-serine at 0.1 g L<sup>-1</sup> infused in mobile phase (A/B: 50/50) at a flow rate of 5 μL.min<sup>-1</sup>. Full scan MS spectra were performed from 100 to 1000 m/z and additional MS<sup>2</sup> scans were realized to get structural information based on daughter ions elucidation. Raw data were processed using Xcalibur software program (version 2.1, <http://www.thermoscientific.com>). MS<sup>2</sup> fragmentation data were interpreted in the way to evaluate chemoselectivity and regioselectivity of the aminoacylases from *S. ambifaciens*.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Enzyme production

All the proteins used in this study were obtained from the same seven days culture of *S. ambifaciens* ATCC23877 after two days of germination and pre-culture steps. After this incubation time, the cells were completely disrupted and the proteins were precipitated using ammonium sulphate. The proteins were then re-suspended and ultra-filtration using a 10 kDa membrane was performed. The filtration step allowed the elimination of almost all ammonium sulphate (decrease of

the conductivity from 30 to 6.5 mS / m) and 135 mL of crude extract containing 21 ± 0.7 g/L protein were recovered from the 5 L culture medium. The apparent specific activity of the extracted proteins was evaluated using lauroyl-lysine synthesis reaction. Dettori et al. (2018) used this reaction for the evaluation of the activity of immobilized acylases from *S. ambifaciens* on mesoporous material [27]. However, in this study equimolar substrate concentrations of 0.1 M were used (the influence of the concentration of each substrate will be treated later). The specific activity of the acylases from *S. ambifaciens* was 33.4 ± 5.0 μM of α-lauroyl-lysine / min / mg of protein. The influence of the pH when performing this reaction was firstly investigated in order to set a fixed pH range of the reaction media for the further reactions (data not shown). The results showed that the enzyme was much less active at pH lower than 6.5 and higher than 8.5 with highest activity around pH 8. So all the further reactions were conducted at pH 8.0.

#### 3.2. Substrate specificity

##### 3.2.1. Acyl acceptor specificity

As described in a previous study [12], acylases from *S. ambifaciens* were able to perform the N-acylation of lysine and peptides with oleic acid on the amine function located on α-position. The specificity towards other amino acids have never been reported. 10-undecenoic acid was used as acyl donor in this study. It is a mono-unsaturated fatty acid having antifungal, antiviral and insect-repelling activity which makes it useful to treat superficial infection [28,29]. It was also described as having neuroprotective and radical-scavenging activities [30]. The enzymatic acylation of amino acids with this fatty acid has never been reported before. All condensation reactions were carried out with 1 g/L of acylases mixture at 45 °C ± 3 °C during 3 days. As shown in Fig. 1, the aminoacylases from *S. ambifaciens* allowed the acylation of amino acids with conversion yields from 5 to 25 %, except for tyrosine, tryptophane, histidine, proline, glutamic and aspartic acids for which the quantity produced was below the detection limit. The results obtained with tyrosine and tryptophane can be attributed to their very low solubility at pH 8 which is the optimal pH of these enzymes. In the case of non-polar aliphatic amino acids and also in the case of polar and non-charged amino acids with hydroxyl group, a relation between the side chain length and the conversion percentage was observed: the longer the chain length the higher the conversion yield. The best results were obtained with lysine, arginine, leucine and methionine with 24 ± 1.5, 22 ± 1.2, 23 ± 0.14 and 20 ± 0.27 % conversion yields, respectively, after 3 days. According to these results, the specificity of the

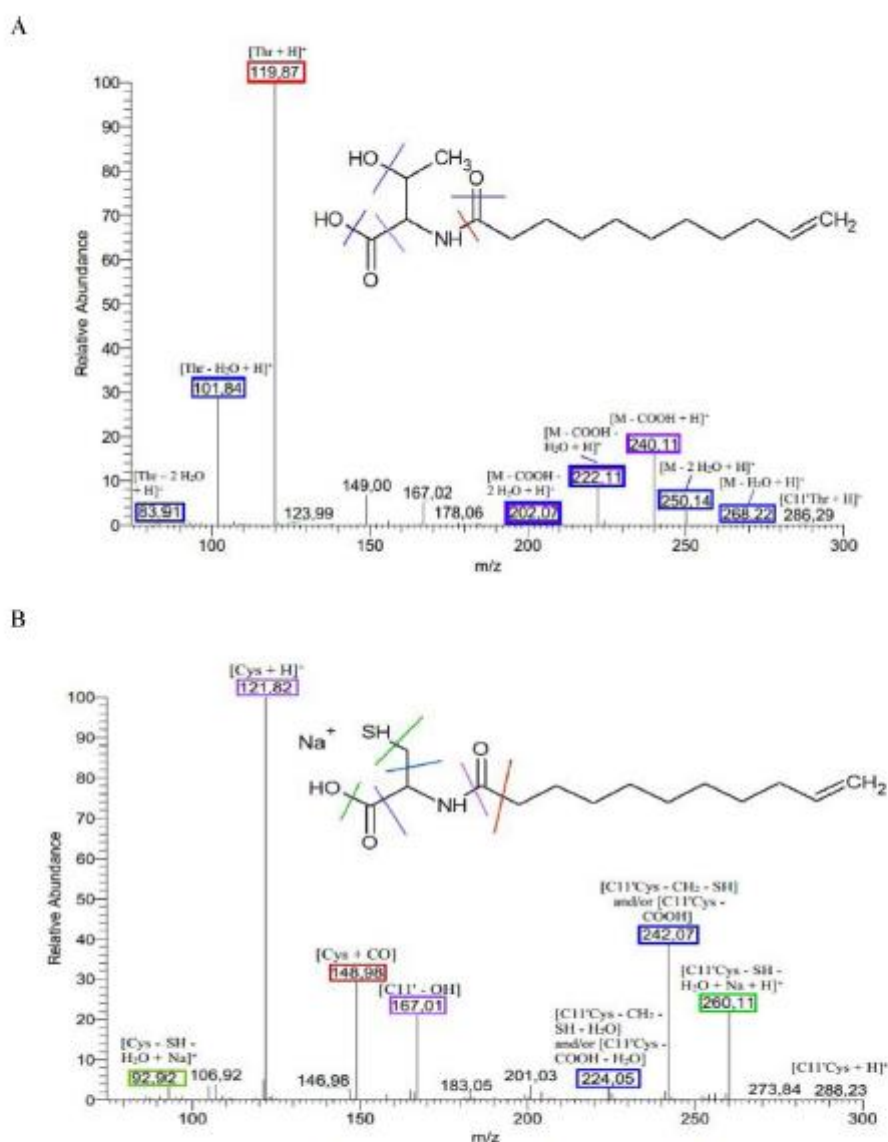


Fig. 2. MS<sup>2</sup> spectra after fragmentation of the parent ion of (A) N-10-undecenyl-threonine (B) N-10-undecenyl-cysteine synthesized using aminoacylases from *S. ambifaciens*.

aminoacylases from *S. ambifaciens* was very different from that described by Koreishi et al. for the aminoacylase (of 100 kDa molecular weight) and the penicillin V acylase (Sm-PVA) from *S. mobarensis* [11,24]. Indeed, these authors used ferulic acid (10 mM) as acyl-donor for the evaluation of the 100 kDa aminoacylase of *S. mobarensis* specificity towards amino acids in tris-HCl buffer pH 7.2, containing 70 % glycerol, for 6 days, at 37 °C. The best conversion yield was around 12 % with phenylalanine and between 0 and 8% with the other amino acids. They were able to improve the conversion rate of lysine by using only tris HCl buffer (pH 7.5) [24]. The evaluation of Sm-PVA specificity was done using lauric acid as acyl-donor (7.5 mM) in tris-HCl buffer containing 78 % glycerol, for 2 days, at 37 °C. The best results were observed with lysine that was acylated on its ε amino group, arginine and cysteine with 44, 32 and 32 % conversion yields, respectively. 0–10% conversion yields were obtained with the other amino acids tested [11]. Recently, Takakura et al. (2019) identified a new aminoacylase from *Burkholderia* sp. specific for the acylation of amino acids with lauric acid. The evaluation of the amino acids specificity was

performed after 60 h at 25 °C in 100 mM sodium borate buffer, pH 9.0, containing 100 mM sodium laurate and 200 mM amino acid. The results showed that the enzyme was able to catalyse the acylation of most of the amino acids, especially when arginine, phenylalanine, lysine or valine (89, 51, 28 and 23 % yield respectively) were used. Like with the aminoacylases from *S. ambifaciens* no product was observed when using aspartic and glutamic acid as substrates [31].

The acylation reaction media were analysed by LC-MS-MS after 3 days of incubation in order to check the presence of the product and to evaluate the chemo and the regioselectivity of the aminoacylases from *S. ambifaciens*. The acylation of amino acids by 10-undecenoic acid led to the formation of mono-acylated products in almost all cases except with glutamic acid and proline where no product was detected. Probably, N-undecenyl-proline was not synthesized because of the cyclic structure of the proline with no primary amino function available. The fragmentation of the parent ion [M + H]<sup>+</sup> of each product generated daughter ions corresponding to [M - COOH + H]<sup>+</sup> or [M - COOH - H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup> or [M - COOH - 2 H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup> which

**Table 1**  
 structure of the acyl receivers used.

Fatty acid	Molecular structure	Reaction
Taurine		-
Hydroxylamine		-
Ethanolamine		-
6-aminohexanoic acid		-
6-amino-1-hexanol		+
4-amino-benzoic acid		-
Carnosine (N-β-alanyl, L-histidin)		-
Glycine		+
Glycine methyl-ester		-
Glycine ethyl-ester		-
Glycine tert-butyl-ester		-

confirmed that the acylation took place on the amino group of the amino acids. In the case of some of the amino acids carrying a reactive side chain, daughter ions that came from the radical part of the acyl-acceptor were generated. Indeed, the fragmentation profiles of acylated serine and threonine, which present a potentially reactive hydroxyl group on their radical part, were very similar. The fragmentation of the parent ion generated daughter ions coming from the carboxyl group and hydroxyl group with no fragment coming from the amine group (Fig. 2). These fragments showed that the acylation reaction occurred only on amino acid amino groups. Cysteine also generated a daughter ion that corresponded to  $[M - \text{CH}_2 - \text{SH}]^+$  coming from the  $-\text{SH}$  group, thus confirming the acylation of the amino acid on its amino group (Fig. 2). However, the LC-MS-MS analysis showed the presence of a mass (241  $m/z$ ) corresponding to the cystine that came from the condensation of two cysteine molecules with disulphide bond bridge formation which has a very low solubility in the buffer [32]. In terms of regioselectivity, the results of the acylation of lysine and arginine showed that the acylation occurred on the  $\alpha$ -position. Indeed, the acylation of lysine with fatty acids has already been described in the literature. Whatever the fatty acid involved, two distinct fragmentation profiles were observed for the  $\alpha$  and the  $\epsilon$ -acyl-lysine [12,33]. The authors showed that for  $\epsilon$  acylated lysine only one major daughter ion corresponding to  $[M - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$  was found, whereas two major daughter ions corresponding to  $[M - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  and  $[M - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$  were obtained for the  $\alpha$ -acylated lysine. In the present study, the fragmentation of the parent ion of undecenoyl-lysine ( $m/z = 313$ ) produced two major daughter ions corresponding to  $[M - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  and  $[M - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$ , showing that acylation took place on the  $\alpha$ -position. The fragmentation of the acylated arginine generated two major daughter ion corresponding to  $[M - \text{NH}_2 - \text{C} - \text{NH}_2 - \text{NH}]$  and

$[M - \text{NH}_2 - \text{C} - \text{NH}_2 - \text{NH} - \text{H}_2\text{O}]$  which indicates also an acylation on the  $\alpha$ -position. This result was in perfect accordance with a previous study using oleic acid as acyl donor. Indeed, Dettori et al. (2017) used lysine and peptides containing lysine as acyl acceptors to show the ability of the aminoacylases from *S. ambifaciens* to perform the N-acylation reaction. They demonstrated that the extracted enzymes catalyse the acylation of the substrates, in alpha position without any acylation on the side chain despite the presence of Sam-ELA which is specific for the acylation of lysine epsilon amino group [9,12]. This result was related to the presence of the aminoacylase Sam-AA which is responsible of more than 85 % of the  $\alpha$ -aminoacylase activity of the extracted enzymes [34].

In order to extend the comprehension of the selectivity of the aminoacylases from *S. ambifaciens*, other molecules like taurine, hydroxylamine, 6-aminohexanoic acid, 4-amino-benzoic acid, ethanolamine and the dipeptide carnosine were used as acyl-acceptor but no acylation reaction was observed (Table 1). However, when 6-amino-1-hexanol was used, a small quantity of the product was detected by LC-MS-MS. This result suggested the negative influence of the carboxyl group at the end of the 6-aminohexanoic acid, which is replaced by a hydroxyl group on the 6-amino-1-hexanol. This may explain the lack of reaction when using the negatively charged amino acids (aspartic and glutamic acids). In order to understand the exact biological mechanism implicated, the structure of the aminoacylase has to be elucidated and a molecular modelling study has to be performed.

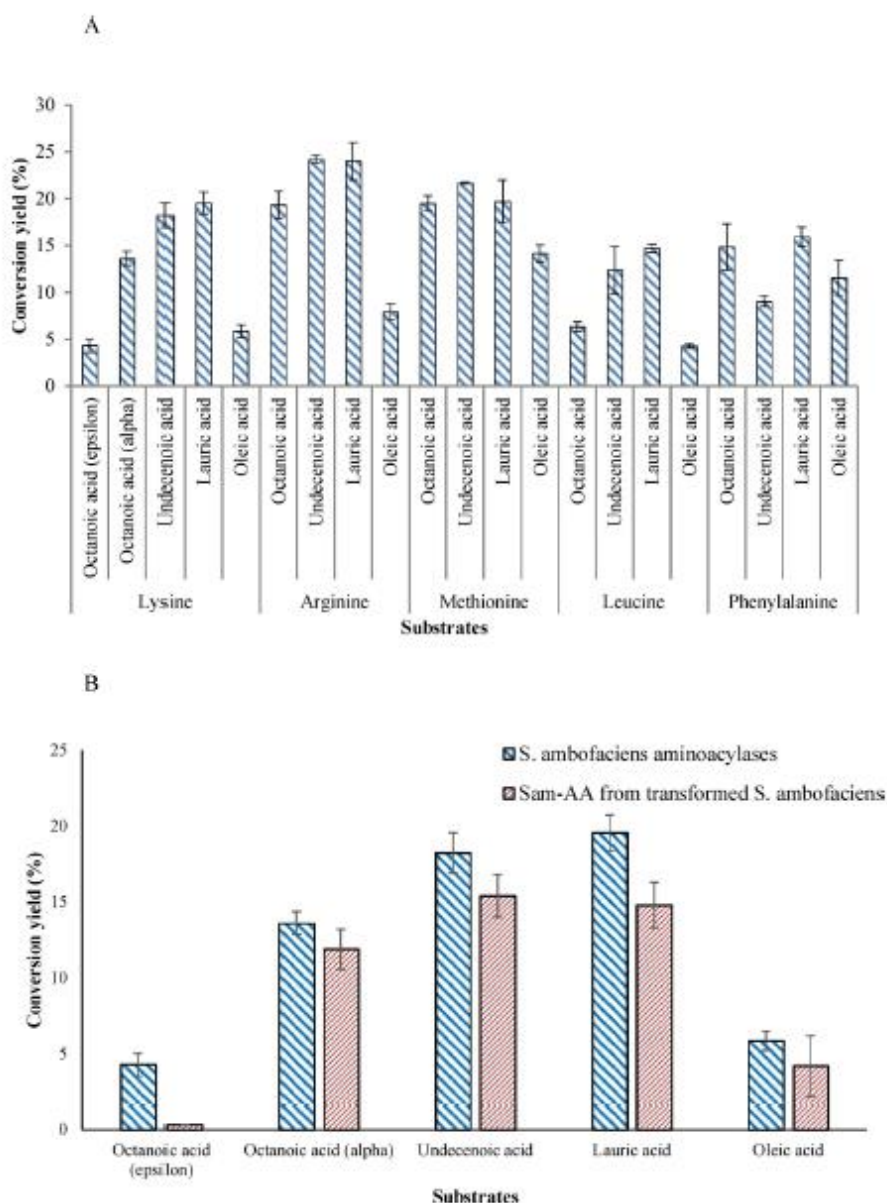
Reactions using glycine ethyl-ester, methyl-ester and tert-butyl-ester as acyl-acceptor were also performed but no conversion was observed. These results showed that the aminoacylases from *S. ambifaciens* have a completely different acyl-acceptor selectivity as compared to a lipase such as CALB. Indeed, several authors described the ability of CALB to perform the acylation of molecules such as carnosine and 6-amino-1-hexanol in organic solvent and ionic liquid [35–37]. They also compared the acylation of amino acids and amino acid derivatives like glycine and glycine tert-butyl-ester, showing an improvement of the conversion rate due to their better solubility in organic solvent. Goujard et al. (2004) evaluated the performances of CALB for the N-acylation reaction of the glycine with arachidonic acid in acetonitrile. They demonstrated that this enzyme was not efficient for the acylation of the glycine. However, the use of an activated amino acid containing tert butyl group on its carboxylic part led to a significant increase in the conversion yield [19]. Those results are completely different from the ones obtained in the present study where an activated amino acid or fatty acid doesn't allow any improvement of the activity.

In order to check the enantio-selectivity of the enzyme, reactions using D-phenylalanine and L-phenylalanine were compared. No acylation of the D-phenylalanine was observed suggesting that aminoacylases from *S. ambifaciens* are very specific to the natural L-amino acids. Koreishi et al. (2005) also showed that the 100 kDa aminoacylase from *S. mobaraensis* wasn't able to catalyse the hydrolysis of the N-acetyl-D-methionine while exhibiting a very high hydrolysis activity of the L-enantiomer, showing the same enantioselectivity as the one of the aminoacylases from *S. ambifaciens* [24].

### 3.2.2. Acyl donor specificity

The evaluation of the specificity towards fatty acids was first performed by using lysine, arginine, methionine, leucine and phenylalanine as acyl-acceptors as these substrates presented high reactivity with different radical groups. Four different fatty acids were used in equimolar conditions (0.1 M of each substrate). The synthesis of N-acyl-amino acids with various fatty acids is reported in Fig. 3.A. The aminoacylases from *S. ambifaciens* showed different activities towards the fatty acids, depending on the amino acid used. The conversion yields obtained for N-acyl-L-phenylalanine derivatives were similar whatever the fatty acid used, with values from 10 to 15 %, after 24 h. Likewise, N-acyl-L-methionine products were obtained with similar conversion yields, however a slight decrease of the conversion yield was noted

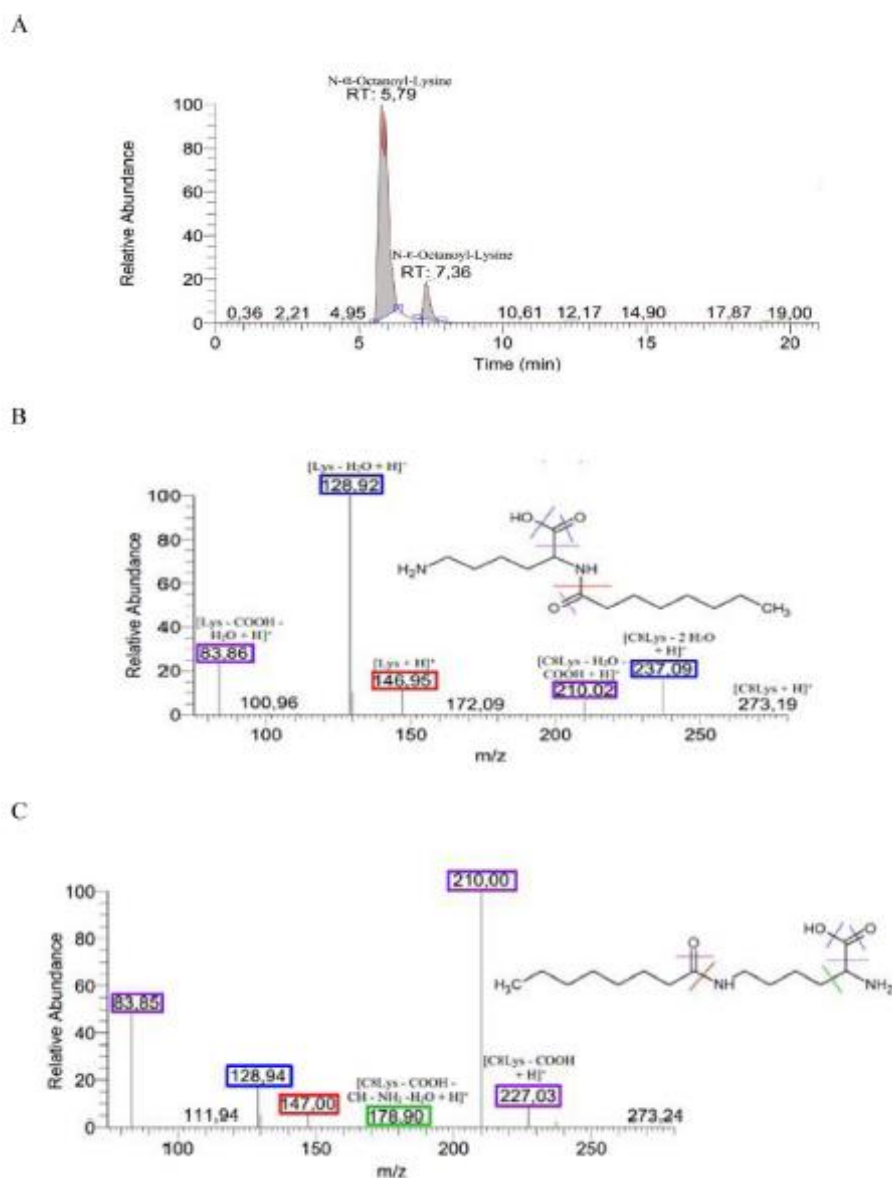




**Fig. 3.** Conversion yields using various amino acids (100 mM) and fatty acids (100 mM). A. acylation of arginine, methionine, leucine and phenylalanine using the aminoacylases from *S. ambofaciens*, B. Acylation of lysine using the aminoacylases from *S. ambofaciens* and Sam-AA from transformed *S. ambofaciens*. Reaction conditions: 1 day, at 45 °C, 250 rpm agitation, in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM pH 8, using 1 g/L enzyme.

when using oleic acid as acyl donor. The results obtained with arginine, lysine and leucine showed an increase of the conversion yields when increasing the fatty acid chain length from C8 to C12, and then, a decrease when oleic acid was used. This result is consistent with the work of Wada et al. (2002) who studied the substrate specificity of the acylase 1 from pig kidney towards different fatty acids, using arginine as acyl-acceptor. They showed nearly the same profile as the one observed with the aminoacylases from *S. ambofaciens* with an increase of the conversion yield from C10 to C12 fatty acid, then a significant decrease with C18 [38]. The final samples were analysed by LC-MS-MS in order to evaluate the influence of the chain length on the regioselectivity of the aminoacylases from *S. ambofaciens*. The MS<sup>2</sup> spectrum after fragmentation of the parent ion of the product of each N-acyl-amino acid did not change by changing the fatty acid confirming that the

ionisation of the product occurred on its amino acid part. This result confirmed that in all cases the acylation of the amino acids on the amine function was preserved. However, the structure of the lysine is particular because of the presence of two reactive amino groups. The products resulting from lysine acylation with the different fatty acids always corresponded to N- $\alpha$ -acyl-lysine derivatives except for octanoic acid that led to the synthesis of both  $\alpha$  and  $\epsilon$ -acyl-lysine. As described in Fig.4, two products corresponding to the same molar mass were found with 1.5 min retention time difference. Those products presented different MS<sup>2</sup> fragmentation profiles where the highest peak corresponded to the  $\alpha$ -acylated lysine, the same as the one described previously, and the second one, with  $[M - H_2O - COOH + H]^+$  as major daughter ion, corresponded to the  $\epsilon$ -acylated lysine. The presence of  $\epsilon$ -octanoyl-lysine can be explained by the presence of Sam-ELA in the crude extract of *S.*



**Fig. 4.** Mass analysis of octanoyl-lysine using aminoacylases from *S. ambifaciens* (A) single ion chromatogram of the acylated product  $[M + H]^+$  parent ion ( $m/z = 273$ ); (B)  $MS^2$  spectrum after fragmentation of the parent ion at 5.79 min retention time; (C)  $MS^2$  spectrum after fragmentation of the parent ion at 7.36 min retention time.

*ambifaciens* which is similar to Sm-ELA from *S. mobarensis* described by Koreishi et al. with 80 % sequence identity [10]. Sm-ELA was able to catalyse the acylation of lysine on its  $\epsilon$ -amino group with 58.7 % conversion yield by using 10 mM octanoic acid, in 100 mM Tris-HCl, pH 7.0 buffer, at 45 °C. However, Sm-ELA also led to 100 % conversion by using lauric acid in the same conditions, which would not be the case with the corresponding enzyme from *S. ambifaciens* which seemed not able to catalyse the acylation of  $\epsilon$ -amino group (Fig. 1). A better acylation of the lysine  $\epsilon$ -position was observed with lauric acid using Sm-PVA compared with the lysine  $\alpha$ -position. No acylation occurred with octanoic acid [11]. The arginine presents also two free amine groups. But the guanidine side chain of this amino acid remains protonated under operational conditions (pH 8) preventing its acylation [6].

In order to check if there is a structural relation between the regioselectivity and the fatty acid chain length, different short chain fatty

acids (acetic acid, butyric acid and valeric acid) were used with lysine as acyl-acceptor (Table 2). The regioselectivity was evaluated by combining TLC and LC-MS-MS analyses (data not shown). In all reactions performed with fatty acid chains shorter than eight carbons, both  $\alpha$  and  $\epsilon$  mono-acylated products were found. However, there was a relation between the chain length and the regioselectivity since short carbon chains seemed to favour acylation on the  $\epsilon$ -position. Also, regioselectivity towards amino group in  $\alpha$ -position was higher with butyric acid as compared to isobutyric acid. This kind of relation has never been reported before. With molecules containing cyclic group such as benzoic acid, 4 amino benzoic and homovanillic acid, no product was detected by LC-MS-MS analysis, except for the phenylpropionic acid. This result can be explained by the short distance between the carboxylic group and the cyclic group which may lead to a steric hindrance. For the phenylpropionic acid, the LC-MS-MS analysis showed

**Table 2**  
 structure of the fatty acids used.

Fatty acid	Molecular structure	Acylation position	
		Alpha	Epsilon
Acetic acid		+	+
Isobutyric acid		+	+
Butyric acid		+	+
Valeric acid		+	+
Octanoic acid		+	+
10-undecenoic acid		+	-
Lauric acid		+	-
Oleic acid		+	-
Azelaic acid*		+	-
Phenylpropionic acid		+	+

acylation on both carboxylic group.

**Table 3**  
 Kinetic parameters of the substrates concentrations for  $\alpha$ -lauryl-lysine synthesis.

	Lysine	Lauric acid
Vmax (mM/h)	3.1 ± 0.2	4.4 ± 0.2
Km (mM)	69 ± 7	2.1 ± 0.3
Ki (mM)	-	85.5 ± 7.8

the presence of both mono-acylated products thus confirming the previous results. Even if this fatty acid contains 9 carbon atoms, the presence of the phenyl group made it similar to short length fatty acids in terms of regioselectivity. Reaction with azelaic acid (C9), which is a dicarboxylic acid widely used in cosmetics, was conducted in the same conditions. The results of the LC-MS-MS analysis showed the presence of a monoacylated product corresponding to the pseudo mass 317  $m/z$  and a diacylated product corresponding to the pseudo mass 487  $m/z$ . The MS<sup>2</sup> fragmentation profiles of the monoacylated product, suggested that acylation occurred on the  $\alpha$ -amino group of the lysine. Another mass corresponding to 444  $m/z$  formed by the condensation of two lysine units with both carboxylic parts of the azelaic acid was also found. This product represents a bolaamphiphile amino acid surfactant which belongs to a product family widely used in household products and cosmetics [3]. These results were confirmed by TLC-MS analysis which showed the three products described before. These results are of clear interest for further studies aiming to produce such products knowing

that the enzymatic synthesis of bolaform surfactants using acylases in aqueous media has never been reported until now. Indeed, several authors used enzymes, such as lipases, in the synthesis of bolaform surfactants [39]. However, a chemical step have to be performed to recover the bolaamphiphilic surfactant. Valivety et al. (1998) performed the reaction of esterification of N-protected amino acids for the synthesis of bolaform surfactant using lipases. However, in order to recover the final product a chemical step had to be performed in order to remove the protection from the amino acids [39]. Consequently, it is the first time that the one-step enzymatic condensation on both carboxylic groups of a diacid is described.

In order to confirm the contribution of Sam-ELA to the acylation of the lysine with octanoic acid on its side chain, the gene sequence that express the production of Sam-ELA and Sam-PVA in *S. ambifaciens* was deleted. This allowed the expression of the sequence corresponding to Sam-AA, which was described as being of major importance in the N- $\alpha$ -acylation activity [34]. The transformed strain was cultivated and the enzyme was extract following the same steps as with the wild strain of *S. ambifaciens*. As shown in the Fig. 3 B, the presence of only Sam-AA allowed the N-acylation of the lysine on its  $\alpha$ -position with all fatty acid used even with octanoic acid with nearly similar conversion rate. Knowing that Sam-PVA is similar to Sm-PVA described by Koreishi et al., 2006 as being specific to the acylation of amino acids with lauric acid only, this result confirms that the  $\epsilon$ -acylation of lysine with octanoic acid observed with the aminoacylases from the non-transformed *S. ambifaciens* was due to the presence of Sam-ELA [11].

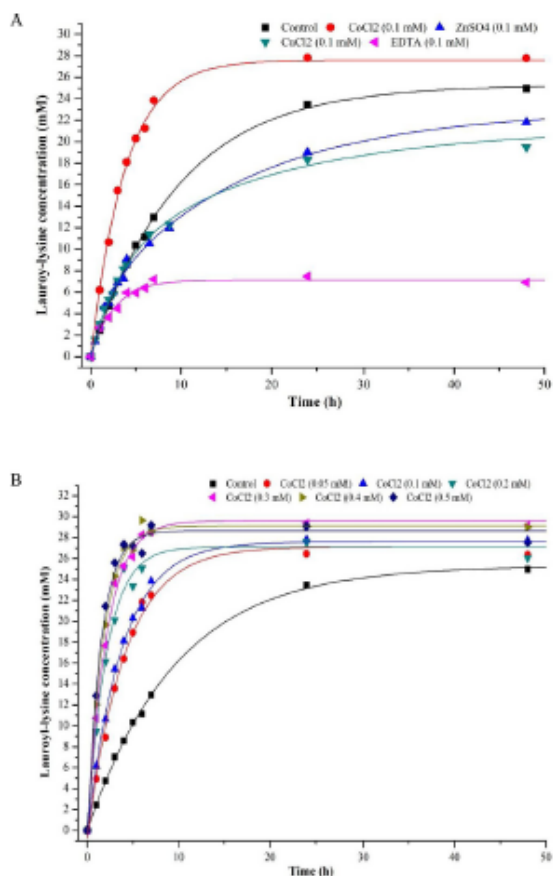


Fig. 5. Influence of metal ions on the initial rate of the  $\alpha$ -lauroyl-lysine (C12 K) synthesis reaction (0.1 M of lauric acid and lysine) using *S. ambifaciens* acylases in tris HCl 25 mM NaCl 50 mM buffer pH 8 at 45 °C, (A) Produced concentration of C12 K during the time according to the metal ion used and the concentration of  $\text{CoCl}_2$  used (B).

3.3. Influence of substrate concentration on the synthesis of N- $\alpha$ -lauroyl-lysine

Lauroyl-lysine is one of the most used acylated derivative of amino-acids among healthcare products due to its interesting surface active property and biological activity. Several studies reported the acylation of lysine on its  $\epsilon$ -position by using lipases or acylases but very few enzymes were described as being able to catalyse the acylation of lysine on its  $\alpha$ -position [12,24]. In order to evaluate the influence of each substrate on the reaction rate, the concentration of one substrate was set to 100 mM while different concentrations of the substrate under study were used (from 25 to 250 mM for lysine and from 10 to 200 mM for lauric acid). The increase of lysine concentration from 25 to 150 mM led to an increase of the initial rate of the reaction. The curves of initial rates followed standard Michaelis-Menten model allowing the

determination of  $K_m$  and  $V_{max}$  for the amino acid. According to the equation of Lineweaver and Burk, a  $V_{max}$  and  $K_s$  of around 3.1 mM / h and 69 mM were found, respectively (Table 3). However, at concentrations higher than 175 mM, a decay in the initial rate was observed. This decay might be due to an inhibition by the amino acid.

The effect of the lauric acid concentration was conducted by using 100 mM lysine and concentrations from 0 to 200 mM of lauric acid. Between 10 and 50 mM lauric acid, a low increase in the conversion was observed but a decrease was observed at concentrations higher than 75 mM. This decrease can be attributed to mass transfer limitation. Wada et al, 2002 also attributed the decrease of the activity by increasing lauric acid concentration when using acylase I from Pig Kidney in buffer/glycerol mixture, to the fatty acid saturation which is reached at around 10 mM [38]. The second reason could be the inactivation or the inhibition of the enzyme by the reaction product [10,15]. In this case,  $V_{max}$  and  $K_i$  of around 4.4 mM h<sup>-1</sup> and 85 mM, respectively, were found (Table 3). A  $K_m$  of around 2 mM was also determined.

3.4. Influence of metal ions on the reaction rate

As described by Dettori et al., [12] the genes encoding the aminoacylases from *S. ambifaciens* present close similarities to the ones encoding acylases from *S. mobarensis*, which were described by Koreishi et al [9,11,25]. Two of those identified acylases (Sm-AA and Sm-ELA) were described as belonging to a metallo-dependant family which can be influenced by the addition of metal ions. In order to evaluate the effect of metal ions on the activity of acylases from *S. ambifaciens*,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , described as the most influencing ones, were added in the reaction medium [10,11,24,25]. As shown in Fig. 5A, for the same concentration of the three metal ions (0.1 mM), the addition of  $\text{Co}^{2+}$  ion led to a three time increase of the initial rate while  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions only led to a low increase of the initial rate. Very low conversion yield was observed when EDTA (metal scavenger) was used, showing that the observed activity originates from a metallo-enzyme. Indeed, even if the initial rate in the presence of EDTA was similar to the one without, a decrease of 75 % of the conversion rate was observed. This result can be explained by a decay of the enzymatic stability when a chelating agent is used. The same result was reported by different authors with others metallo-enzymes, where a partial decrease of the activity was registered when using EDTA [10,24,31]. However, the conversion rate at thermodynamic equilibrium decreased to 11 and 17 % using  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions, respectively at 0.1 mM, while it remained stable with  $\text{Co}^{2+}$ . The influence of  $\text{Co}^{2+}$  concentration was therefore investigated (Fig. 5B). The increase of the Cobalt concentration up to 0.4 mM allowed an important increase (about 6 times) of the initial rate of the reaction (Table 4). The thermodynamic equilibrium in those conditions was reached after only 4 h reaction time instead of around 72 h without  $\text{CoCl}_2$ . The LC-MS-MS analysis did not show any modification in the regioselectivity of the enzyme. Koreishi et al 2005 also studied the influence of metal ions on the hydrolytic activity of *S. mobarensis* aminoacylaseS. Their results were similar to the ones of the present study with an increase of around 3 times of the activity by adding 0.1 mM  $\text{CoCl}_2$ . However, they observed a decrease of around 80 % of the activity by adding  $\text{Cu}^{2+}$  ion, which was not the case of the acylases from *S. ambifaciens* [24].

Table 4 Initial rate evolution depending on the condition.

Metal ion	No metal ions	EDTA	$\text{CuCl}_2$	$\text{ZnSO}_4$	$\text{CoCl}_2$	$\text{CoCl}_2$				
Concentration (mM)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.2	0.3	0.4	0.5
Initial rate (mM / h)	2.6 ± 0.4	2.4 ± 0.2	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.0	6.3 ± 0.6	4.6 ± 0.1	12.1 ± 0.2	14.2 ± 0.0	14.6 ± 1.8	15.8 ± 2.0

#### 4. Conclusion

The performances of the aminoacylases from *S. ambifaciens* in terms of substrate specificity and regioselectivity were evaluated. This work showed for the first time a relationship between the side chain length of the amino acids, especially with non-polar aliphatic amino acids, and the conversion rate (from 6% for glycine to 23 % for leucine). Furthermore, the side chain nature of the amino acid was shown to play an important role. Best results were obtained with positively charged amino acids (lysine and arginine) while no reaction was obtained with the negatively charged ones (aspartic and glutamic acids). The results concerning the acyl donor specificity showed that the regioselectivity was affected by the fatty acid chain length which was attributed to the presence of Sam-ELA in the crude extract of *S. ambifaciens*. Indeed, this enzyme is able to perform the acylation of the lysine on its side chain and appears to be also specific for short chain fatty acid. Moreover, for the first time, the possible synthesis of bolaamphiphile amino acid surfactant using azelaic acid and lysine was shown. The study concerning the synthesis of lauroyl lysine in various operational conditions showed an inhibition of the enzymes by the product of the reaction. In order to overcome this issue, the future development of processes using continuous flow reactors such as packed bed reactors with immobilized aminoacylases from *S. ambifaciens* appears as a promising way. The results obtained in the presence of metal ions showed that it was possible to significantly increase the reaction by adding  $\text{CoCl}_2$  that allowed to reach the thermodynamic equilibrium in few hours. Further works are in progress to intensify the process increasing the conversion yield in order to develop a green process for the production of eco-friendly lipoaminoacids as bio-based surfactant using *S. ambifaciens* aminoacylases in aqueous media.

#### CRedit authorship contribution statement

**Mohamed Chafik Bourkaih:** Investigation, Writing - original draft. **Stephane Delaunay:** Conceptualization, Supervision. **Xavier Framboisier:** Resources. **Laurence Hôtel:** Resources. **Bertrand Aigle:** Conceptualization. **Catherine Humeau:** Conceptualization, Methodology. **Yann Guivarc'h:** Conceptualization, Supervision. **Isabelle Chevalot:** Conceptualization, Supervision.

#### Acknowledgments

This work was supported partly by the "Impact biomolecules" project of the « Lorraine Université d'Excellence » (PIA-ANR), the French National Research Agency (ANR) through the "ISEAPIM3" project (ANR-15-CE07-0023-01), the "Structure Fédérative de Recherche Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation" of the University of Lorraine.

#### References

- [1] M.R. Infante, L. Pérez, M.C. Morán, R. Pons, M. Mitjans, M.P. Vinardell, M.T. Garcia, A. Pinazo, Biocompatible surfactants from renewable hydrophiles, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 110–121, <https://doi.org/10.1002/eflt.200900110>.
- [2] C. Rondé, I. Alric, Z. Mouloungui, J.-F. Blanco, F. Silvestre, Synthesis and properties of lipoamino acid-fatty acid mixtures: influence of the amphiphilic structure, *J. Surfactants Deterg.* 12 (2009) 269–275, <https://doi.org/10.1007/s11743-009-1121-y>.
- [3] D.B. Tripathy, A. Mishra, J. Clark, T. Farmer, Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: a review, *Comptes Rendus Chim.* 21 (2018) 112–130, <https://doi.org/10.1016/j.crci.2017.11.005>.
- [4] D. Yea, S. Lee, S. Jo, H. Yu, J. Lim, Preparation of environmentally friendly amino acid-based anionic surfactants and characterization of their interfacial properties for detergent products formulation, *J. Surfactants Deterg.* 21 (2018) 541–552, <https://doi.org/10.1002/jsde.12051>.
- [5] L. Pérez, A. Pinazo, M. Teresa García, M. Lozano, A. Manresa, M. Angelet, M. Pilar Vinardell, M. Mitjans, R. Pons, M. Rosa Infante, Cationic surfactants from lysine: synthesis, micellization and biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1884–1892, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.11.003>.

- [6] A. Pinazo, M.A. Manresa, A.M. Marques, M. Bustelo, M.J. Espuny, L. Pérez, Amino acid-based surfactants: new antimicrobial agents, *Adv. Colloid Interface Sci.* 228 (2016) 17–39, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.11.007>.
- [7] N. Joondan, S.J. Lallouo, P. Caumal, Amino acids: building blocks for the synthesis of greener amphiphiles, *J. Dispers. Sci. Technol.* 39 (2018) 1550–1564, <https://doi.org/10.1080/01932691.2017.1421085>.
- [8] R.A. Sheldon, J.M. Woodley, Role of biocatalysis in sustainable chemistry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 801–838, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.
- [9] M. Koréishi, R. Kawasaki, H. Imanaka, K. Imamura, Y. Takakura, K. Nakanishi, Efficient N-lauroyl-L-lysine production by recombinant  $\alpha$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis*, *J. Biotechnol.* 141 (2009) 160–165, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.03.008>.
- [10] M. Koréishi, R. Kawasaki, H. Imanaka, K. Imamura, K. Nakanishi, A novel  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of N- $\epsilon$ -acyl-L-lysines, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (2005) 631–637, <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1121-2>.
- [11] M. Koréishi, D. Zhang, H. Imanaka, K. Imamura, S. Adachi, R. Matsuno, K. Nakanishi, A novel acylase from *Streptomyces mobaraensis* that efficiently catalyzes hydrolysis/Synthesis of capsulins as well as N-Acyl-L-amino acids and N-Acyl-peptides, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 72–78, <https://doi.org/10.1021/jf052102k>.
- [12] L. Dettori, F. Ferrari, X. Framboisier, C. Paris, Y. Guivarc'h, L. Hôtel, A. Aymes, P. Leblond, C. Humeau, R. Kapel, I. Chevalot, B. Aigle, S. Delaunay, An aminoacylase activity from *Streptomyces ambifaciens* catalyzes the acylation of lysine on  $\alpha$ -position and peptides on N-terminal position, *Eng. Life Sci.* 18 (2017) 589–599, <https://doi.org/10.1002/elsc.201700173>.
- [13] C. Bernal, F. Guzman, A. Illanes, L. Wilson, Selective and eco-friendly synthesis of lipoamino acid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts, *Food Chem.* 239 (2018) 189–195, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.105>.
- [14] D. Morlet, F. Servat, M. Pina, J. Graille, P. Galzy, A. Arnaud, H. Ledon, L. Marcou, Enzymatic synthesis of N- $\epsilon$ -acyllysines, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67 (1990) 771–774, <https://doi.org/10.1007/BF02540489>.
- [15] E.L. Soo, A.B. Salleh, M. Basri, R.N. Zaliha Raja Abdul Rahman, K. Kamaruddin, Optimization of the enzyme-catalyzed synthesis of amino acid-based surfactants from palm oil fractions, *J. Biosci. Bioeng.* 95 (2003) 361–367, [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80068-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80068-3).
- [16] P. Villeneuve, Lipases in lipophilization reactions, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 515–536, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.06.001>.
- [17] R. Valvety, P. Jauregi, I. Gil, E. Vulfson, Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 879–886, <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0232-8>.
- [18] T. Izumi, Y. Yagimura, M. Haga, Enzymatic syntheses of N-lauroyl- $\beta$ -alanine homologs in organic media, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 875–878, <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0231-9>.
- [19] L. Goujard, M.C. Figueroa, P. Villeneuve, Chemo-enzymatic synthesis of N-arachidonyl glycine, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 1211–1216, <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000036597.25673.33>.
- [20] E. Husson, C. Humeau, C. Paris, R. Vanderesse, X. Framboisier, I. Marc, I. Chevalot, Enzymatic acylation of polar dipeptides: influence of reaction media and molecular environment of functional groups, *Process Biochem.* 44 (2009) 428–434, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.011>.
- [21] S.P.F. Costa, A.M.O. Azevedo, P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, Environmental impact of ionic liquids: recent advances in (Eco)toxicology and (Bio)degradability, *ChemSusChem.* 10 (2017) 2321–2347, <https://doi.org/10.1002/cssc.201700261>.
- [22] A. Ferjančić-Biagini, T. Giardina, M. Reynier, A. Puigserver, Hog kidney and intestine aminoacylase-catalyzed acylation of L-Methionine in aqueous media, *Biocatal. Biotransformation* 15 (1997) 313–323, <https://doi.org/10.3109/10242429709003197>.
- [23] S.R. Morelle, C.S. Liggieri, M.A. Bruno, N. Priolo, P. Clapés, Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants, *J. Mol. Catal., B Enzym.* 57 (2009) 177–182, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.013>.
- [24] M. Koréishi, F. Asayama, H. Imanaka, K. Imamura, M. Kadota, T. Tsuno, K. Nakanishi, Purification and characterization of a novel aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 1914–1922, <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1914>.
- [25] M. Koréishi, Y. Nakatani, M. Ooi, H. Imanaka, K. Imamura, K. Nakanishi, Characterization Purification, Molecular Cloning, and Expression of a New Aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis* That Can Hydrolyze N-(Middle/Long)-chain-fatty-acyl-L-amino Acids as Well as N-Short-chain-acyl-L-amino acids, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009) 1940–1947, <https://doi.org/10.1271/bbb.90081>.
- [26] D. Zhang, M. Koréishi, H. Imanaka, K. Imamura, K. Nakanishi, Cloning and characterization of penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*, *J. Biotechnol.* 128 (2007) 788–800, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.017>.
- [27] L. Dettori, F. Vibert, Y. Guivarc'h, S. Delaunay, C. Humeau, J.L. Blin, I. Chevalot, N- $\alpha$ -acylation of lysine catalyzed by immobilized aminoacylases from *Streptomyces ambifaciens* in aqueous medium, *Microporous Mesoporous Mater.* 267 (2018) 24–34, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.03.018>.
- [28] W.-L. Gao, N. Li, M.-H. Zong, Highly regioselective synthesis of undecylenic acid esters of purine nucleosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B, *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 2233, <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0685-6>.
- [29] D. Shi, Y. Zhao, H. Yan, H. Fu, Y. Shen, G. Lu, H. Mei, Y. Qiu, D. Li, W. Liu, Antifungal effects of undecylenic acid on the biofilm formation of *Candida albicans*, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 54 (2016) 343–353, <https://doi.org/10.5414/CP202460>.
- [30] E. Lee, J.-E. Eom, H.-L. Kim, D.-H. Kang, K.-Y. Jun, D.S. Jung, Y. Kwon,

- Neuroprotective effect of undecylenic acid extracted from *Ricinus communis* L. Through inhibition of  $\mu$ -calpain, *Bur. J. Pharm. Sci.* 46 (2012) 17–25, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.015>.
- [31] Y. Takakura, Y. Asano, Purification, characterization, and gene cloning of a novel aminoacylase from *Burkholderia* sp. Strain LP5\_18B that efficiently catalyzes the synthesis of N-lauroyl-L-amino acids, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83 (2019) 1964–1973, <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1630255>.
- [32] E. Königsberger, Z. Wang, L.-C. Königsberger, Solubility of L-Cystine in NaCl and artificial urine solutions, *Monatsh. Chem. Mon.* 131 (2000) 39–45, <https://doi.org/10.1007/s007060050004>.
- [33] L. Dettori, C. Jelsch, Y. Guisvarech, S. Delaunay, X. Framboisier, I. Chevalot, C. Humenu, Molecular rules for selectivity in lipase-catalysed acylation of lysine, *Process Biochem.* 74 (2018) 50–60, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.021>.
- [34] F. Ferrari, Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides : prédiction de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases, Université de Lorraine, 2014 (accessed May 6, 2019), <http://www.theses.fr/2014LORR0252>.
- [35] E. Husson, C. Humenu, C. Harcoat, X. Framboisier, C. Paris, E. Dubreucq, I. Marc, I. Chevalot, Enzymatic acylation of the polar dipeptide, carnosine reaction performances in organic and aqueous media, *Process Biochem.* 46 (2011) 945–952, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.007>.
- [36] E. Husson, C. Humeau, F. Blanchard, X. Framboisier, I. Marc, I. Chevalot, Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 55 (2008) 110–117, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.02.004>.
- [37] E. Husson, V. Garcia-Matilla, C. Humeau, I. Chevalot, F. Fournier, I. Marc, Enzymatic acylation of a bifunctional molecule in 2-methyl-2-butanol: kinetic modelling, *Enzyme Microb. Technol.* 46 (2010) 338–346, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.008>.
- [38] E. Wada, M. Handa, K. Imamura, T. Sakiyama, S. Adachi, R. Matsuno, K. Nakanishi, Enzymatic synthesis of N-acyl-L-amino acids in a glycerol-water system using acylase I from pig kidney, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (2002) 41–46, <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0432-7>.
- [39] R. Valivety, I.S. Gill, E.N. Vulfson, Application of enzymes to the synthesis of amino acid-based bola and gemini surfactants, *J. Surfactants Deterg.* 1 (1998) 177–185, <https://doi.org/10.1007/s11743-998-0017-3>.

### 4.3 Contribution de l'article

Cette étude a permis d'évaluer le potentiel catalytique des aminoacylases de *S. ambofaciens* en termes de sélectivité et de spécificité de substrats en milieu aqueux. Les résultats ont permis de mettre en évidence un large champ d'application de ces enzymes pour la production d'acides aminés acylés. Les conditions opératoires ont aussi été évaluées permettant de démontrer l'effet des substrats, du produit et de l'ajout d'activateurs sur les cinétiques enzymatiques.

Dans un premier temps, la spécificité de substrat envers les accepteurs d'acyle a été étudiée. Les réactions ont été menées en utilisant l'acide 10-undécénoïque comme donneur d'acyle. Les résultats ont montré que la majorité des acides aminés ont été acylés sauf ceux présentant un groupement carboxylique au niveau de la chaîne latérale (acide glutamique et acide aspartique) ainsi que la proline. Pour la tyrosine, le tryptophane et l'histidine, une très faible production de dérivés acylés a été observée mais probablement liée à des problèmes de solubilité de ces acides aminés dans les milieux réactionnels. Les aminoacylases ont montré une régiosélectivité en faveur de la position alpha dans tous les cas et une énantiosélectivité envers les acides aminés naturels. Elles se sont avérées incapables de réaliser la réaction d'acylation en présence de dérivés d'acides aminés (ester de glycine). Ces résultats sont très prometteurs dans une perspective de développement et d'optimisation de l'acylation sélective d'acides aminés en milieux aqueux.

Dans un second temps, la spécificité de substrat de ces enzymes envers les donneurs d'acyle a été étudiée à partir d'acides gras de longueurs de chaîne variables. Plusieurs acides aminés ont été utilisés comme accepteurs d'acyle dont la lysine pour également étudier la régiosélectivité. Les aminoacylases ont été capables de catalyser la réaction d'acylation en utilisant tous les donneurs d'acyles testés (de C2 à C18 avec différentes configurations). Par ailleurs, en termes de régiosélectivité, la diminution de la longueur de la chaîne carbonée à un nombre de carbones inférieur à 8 a conduit à l'apparition de produit acylé en position epsilon. Cela peut être lié à la présence, parmi les enzymes de l'extrait brut, de Sam-ELA qui catalyse préférentiellement l'acylation de l'amine primaire en position epsilon de la lysine. Cela met la lumière sur l'importance de l'étude plus approfondie de l'influence de la longueur de la chaîne sur les performances catalytiques de ces enzymes. En effet, dans une étude précédente, il a été démontré que les aminoacylases de *S. ambofaciens* étaient spécifiques de l'acylation de l'amine en position alpha en présence de l'acide oléique (Dettori et al., 2017). Cette spécificité a été reliée à l'activité de Sam-AA. Mais les résultats obtenus dans notre étude indiquent soit une amélioration de l'activité de Sam-ELA soit une possible modification de régiosélectivité de

Sam-AA en présence d'acides gras à courte chaîne. Dans le cas de cette seconde hypothèse, le changement de régiosélectivité pourrait s'expliquer par un mouvement plus libre de la lysine au sein du site catalytique de Sam-AA en raison d'un encombrement stérique moins important permettant une acylation au niveau des deux amines primaires disponibles. Seule l'étude des performances catalytiques de Sam-AA purifiée permettra de confirmer cette hypothèse. A cet effet, les objectifs des parties présentées dans la partie suivante ont été de produire et d'étudier les spécificités de substrat de cette enzyme.

Les résultats de notre étude ont également permis de mettre en évidence l'influence positive de l'acide aminé (lysine) et l'effet inhibiteur de l'acide gras (acide laurique). L'utilisation d'ions métalliques tels que le zinc, le cuivre et plus particulièrement le cobalt ont permis une accélération jusqu'à 7 fois de la vitesse initiale de la réaction de synthèse de lauroyl-lysine. L'ensemble de ces résultats nous ont fourni des voies d'optimisation des performances catalytiques des aminoacylases de *S. ambofaciens* qui seront appliquées à la synthèse d'un acide aminé acylé d'intérêt cosmétique, la N-10-undecenoyl-phenylalanine. Ce travail fera l'objet du chapitre 6.

### 4.4 Résultats complémentaires

#### 4.4.1 Production hétérologue des aminoacylases

La première stratégie suivie afin de pouvoir produire et caractériser les différentes aminoacylases de *S. ambofaciens* séparément a été de réaliser une expression hétérologue de ces dernières chez *Escherichia coli*.

L'expression bactérienne, en particulier *E. coli*, représente l'un des systèmes de production hétérologue les plus utilisés, car elle est généralement économique et nécessite une expertise technique moins importante. De plus, *E. coli* présente des avantages en termes de croissance (temps de génération de l'ordre de 20 minutes) et de diversité génétique et métabolique importante. Afin de transférer le gène codant pour la protéine dans l'hôte, l'utilisation d'un vecteur (plasmide) est nécessaire. Ce dernier doit comporter l'insert ainsi que plusieurs éléments nécessaires à la production hétérologue (le promoteur, le réplicon, le site de fixation aux ribosomes et un système de sélection de la souche contenant le plasmide).

Les plasmides de la famille pET sont très utilisés pour la production hétérologue des protéines, grâce au système du promoteur T7. En effet, les protéines dont l'expression est régulée par ce promoteur peuvent représenter 50% de la quantité totale des protéines cellulaires traduites. Le système permet d'atteindre ce niveau d'expression grâce à sa reconnaissance par la T7 ARN polymérase. Cette dernière est capable de synthétiser des ARN 5 fois plus rapidement comparée



à la polymérase native d'*E. coli*. Dans ce type de vecteur, l'expression est contrôlée par l'analogue du lactose : l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Baolei, Jeon, 2019). L'expression hétérologue de l'aminocyclase Sam-ELA de *S. ambofaciens* a été tentée préalablement chez la levure *Pichia pastoris* X33 en utilisant le plasmide pPICZ $\alpha$ A (3329 pb) comme vecteur plasmidique. Une optimisation du gène à cloner avait été réalisée en raison de la différence d'usage de codons entre *S. ambofaciens* et *P. pastoris* mais une altération de la régio-spécificité de l'enzyme pour la N $\epsilon$ -acétyl-L-Lysine avait été observée (Ferrari, 2014a). Lors d'un autre travail préalable au niveau du laboratoire visant l'expression hétérologue de la même enzyme, la souche *E. coli* BL21 avec le plasmide pET-15b via une induction à l'IPTG a été utilisée. Ces conditions d'expression ont mené à la formation majoritaire de corps d'inclusion et très peu d'enzyme sous forme soluble. L'expression des protéines recombinantes chez *E. coli* a été décrite comme conduisant souvent à l'apparition de corps d'inclusion due à l'agrégation de ces derniers sous forme inactive à l'intérieur de la cellule. En effet, environ 70% des protéines recombinantes sont surexprimées sous forme insoluble chez *E. coli* (Yang et al., 2011). En général, ceci est dû à l'incapacité de cette souche à réaliser une bonne maturation des protéines conduisant à de mauvais repliements, à l'agrégation ou à la perte d'activité des enzymes produites (Safary et al., 2019). Une autre souche d'*E. coli* Origami B(DE3) a donc été utilisée comme hôte dans le cadre de notre étude. En effet, cette souche favorise l'expression des protéines recombinantes sous forme soluble, grâce aux mutations au niveau des gènes de la thiorédoxine réductase (trx B) et des gènes de la glutathion réductase (gor), permettant d'améliorer la formation de ponts disulfures pour une meilleure conformation protéique, augmentant ainsi les performances de l'expression (Prinz et al., 1997 ; Safary et al., 2019). Le plasmide pET-15b a aussi été utilisé dans ce cas. Ce dernier contient un gène de résistance à l'ampicilline, permettant la sélection des souches transformées ainsi qu'une séquence qui permet d'ajouter une étiquette poly-histidine ce qui facilite la purification de la protéine produite. Par ailleurs, la température d'incubation des souches transformées après induction a été abaissée de 37 °C à 16 °C, ceci dans le but de favoriser l'expression protéique en favorisant un bon repliement des enzymes recombinantes permettant par conséquent, la diminution de la formation de corps d'inclusion (Rosano, Ceccarelli, 2014). En effet, une température supérieure à 16°C favorise les interactions hydrophobes entre les protéines ce qui augmente l'agrégation de ces dernières à l'intérieur de la cellule (Sørensen, Mortensen, 2005). D'autre part, la réduction de la concentration en inducteur (IPTG) de 1 à 0,1 mM peut assurer un bon compromis entre l'induction de l'expression protéique sans affecter la croissance d'*E. coli* (Gopal, Kumar, 2013). Selon certaines études, une forte concentration en IPTG réduit la

vitesse de croissance de la souche en raison de la production de protéines toxiques ou de l'expression de protéases, réduisant l'efficacité de la production de protéines recombinantes (Dvorak et al., 2015). D'autre part, une très faible concentration en IPTG peut ne pas assurer une induction suffisante de l'expression protéique (De León et al., 2004). Une concentration de 0,1 mM en IPTG était suffisante pour induire l'expression des aminoacylases recombinantes, sans effets négatifs (Marini et al., 2014). Ces modifications ont été réalisées afin d'augmenter la probabilité d'obtenir une expression des aminoacylases de *S. ambofaciens* sous forme soluble.

#### 4.4.1.1 Evaluation de l'expression hétérologue des différentes aminoacylases de *S. ambofaciens* chez *E. coli* Origami B(DE3)

L'expression des trois aminoacylases (Sam ELA, Sam PVA et Sam AA) a été réalisée chez *E. coli* Origami B(DE3) transformée par les plasmides pET-15b/sam ELA, pET-15b/ sam PVA ou pET-15b/ sam AA suite à une induction par 0,1 mM d'IPTG à 16°C avec comme référence une souche non transformée. Les précultures ont été réalisées dans du milieu LB + tétracycline (12,5 µg/mL) + kanamycine (50 µg/mL) + ampicilline (100 µg/mL ; sauf dans le cas des souches non transformée) pendant une nuit à 37°C, 200 rpm. Les souches ont été par la suite inoculées à une densité optique (longueur d'onde de 600 nm) proche de 0,05 dans le milieu de culture (milieu LB + ampicilline (excepté pour *E. coli* Origami B (DE3))) puis incubées à 37°C et 200 rpm d'agitation. L'ajout 0.1 mM d'IPTG a été effectué à une DO comprise entre 0,6 et 0,9 avec un ajustement de la température d'incubation à 16°C. Des prélèvements de 1 mL de milieu de culture et des mesures de DO à 600 nm ont été réalisés avant et après induction jusqu'à l'arrêt de culture (18h – 20h après induction).

Le suivi de la croissance des différentes cultures, représenté sur la figure 4.1, montre clairement que l'ajout d'IPTG n'a pas provoqué d'arrêt de la croissance (pas de toxicité vis-à-vis d'*E. coli*). La croissance des souches *E. coli* Origami B(DE3) pET-15b/SamELA était plus faible que les autres, un temps d'attente plus important a été nécessaire avant l'ajout d'IPTG.

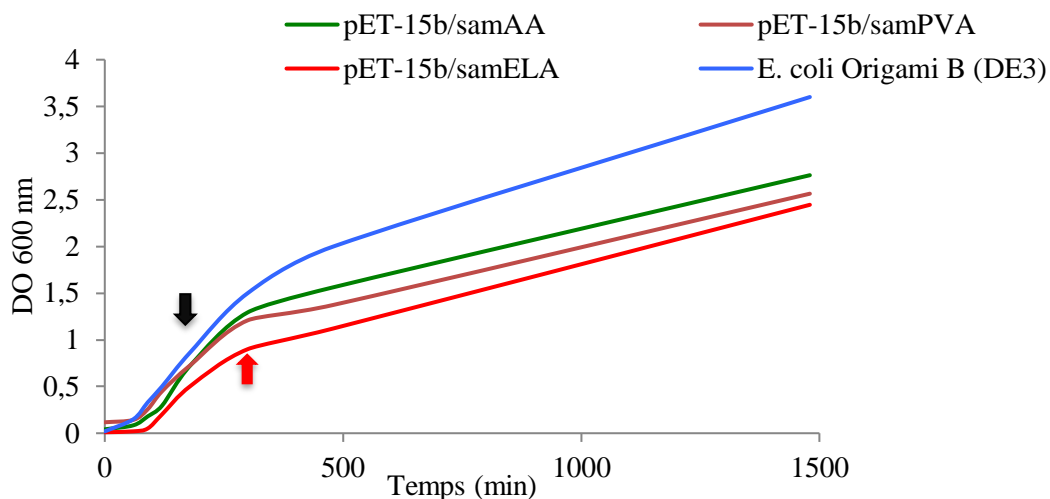


Figure 4.1 : Suivi de la densité optique du milieu de culture, à 600nm, lors de l'expression protéique chez les souches *E. coli* Origami B(DE3) transformées par les plasmides pET15b/ SamAA, pET-15b/ SamPVA ou pET-15b/ SamELA ; et la souche non transformée. Le moment d'induction est indiqué par la flèche noire (pour pET-15b/ SamAA, pET-15b/ Sam PVA, et *E. coli* Origami B (DE3)), et la flèche rouge (pour pET-15b/ SamELA).

Après récupération des cellules par centrifugation (8000 rpm, 4°C, 10 min), lavage et re-suspension (tampon Tris HCl 25mM, NaCl 50 mM, pH 8), une lyse des cellules a été réalisée à l'aide de la presse de French (1 passage à 2 Kbar) afin de libérer les protéines intracellulaires. Cela a été suivi d'une élimination des débris cellulaires par centrifugation du lysat (11000 rpm, 20 min, 4°C) et une concentration du surnageant contenant les protéines solubles par ultrafiltration dans des systèmes Amicon Ultra-15 ; Millipore (4000g, 4°C, 15 min). Le profil protéique de tous les échantillons, avant et après induction, a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE).

Les électrophorèses des mélanges protéiques issus des cultures des souches d'*E. coli* Origami B (DE3) transformées (figure 4.2) montrent qu'il y'a eu expression de protéines correspondant aux poids moléculaires de Sam-ELA et de Sam-AA recombinantes mais pas de Sam-PVA. En effet, Sam ELA est une enzyme monomérique qui possède un poids moléculaire de 61 kDa ce qui correspond environ à la taille de la protéine identifiée sur le gel. Cette bande est absente avant induction mais apparaît 3 h après induction et s'intensifie après 15 h induction (figure 4.2.B). Cela confirme l'expression de cette protéine. De même, le gel SDS-PAGE (figure 4.2.D) montre aussi l'apparition d'une bande qui s'intensifie après 20 h d'induction. Cette dernière correspond à un poids moléculaire aux alentours de 56 kDa similaire à celui de Sam AA ce qui suggère l'expression de cette enzyme. Le gel sur lequel ont été déposés les mélanges protéiques extraits de la souche transformée avec le plasmide pET-15b/ sam-PVA ne permet pas de visualiser d'expression de protéines après induction. Sachant que Sam PVA est une protéine

hétérodimérique (sous unité  $\alpha$  de 19 kDa, et sous unité  $\beta$  de 61 kDa), aucune protéine de cette taille ne semble avoir été exprimée (figure 4.2.C).

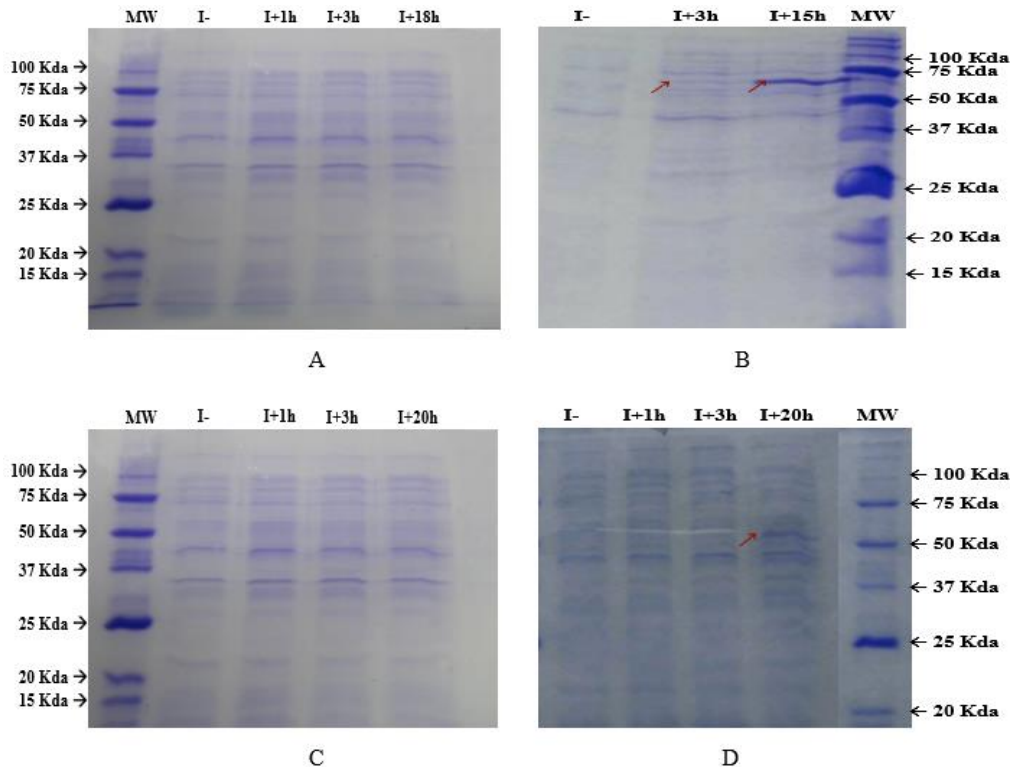


Figure 4.2 : Électrophorèses SDS-PAGE des mélanges protéiques issues des cultures d'*E. coli* Origami B (DE3) non transformée (A), transformée avec le plasmide pET-15b/ sam-ELA (B), transformée avec le plasmide pET-15b/ sam-PVA (C), et transformée avec le plasmide pET-15b/ sam-AA (D). MW : Marqueur de taille (Unstained Precision Plus Protein Standards ; BioRad) ; I- : avant induction ; I+Xh : X heures après induction à 0,1mM IPTG. Les flèches rouges indiquent la position des protéines exprimées.

Etant donné la faible intensité de la bande correspondant au poids moléculaire de Sam-AA (figure 4.2.D), une étude a été réalisée sur l'influence de la concentration de l'inducteur sur l'expression de Sam AA en utilisant plusieurs concentrations d'IPTG (0, 0,05, 0,1 et 0.25 mM). Ces expériences ont été réalisées afin de tenter d'augmenter l'expression de l'enzyme et de réduire la présence de corps d'inclusion. Les cultures, l'induction et l'extraction des protéines ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. L'analyse par SDS-PAGE du culot des cultures d'*E. coli* Origami B (DE3) / pET-15b/ Sam-AA a montré la présence de corps d'inclusion formés par l'agrégation et l'accumulation des protéines à l'intérieur des souches transformées. Ces dernières ont une masse moléculaire similaire à celle de Sam-AA (environ 56 kDa) et sont présentes uniquement quand il y a induction (figure 4.3). Dans le cas des métalloprotéines comme Sam-AA, la présence de zinc ou d'un autre ion divalent est crucial pour l'activité et la stabilité de la structure de l'enzyme. Story et al., 2001 lors de l'expression

hétérologue de l'aminocyclase de *Pyrococcus furiosus* chez *E. coli*, ont relié la perte d'activité enzymatique à la formation de corps d'inclusion et une altération de la structure de l'enzyme due à l'incapacité de cette souche à incorporer le bon métal dans la structure (Story et al., 2001).

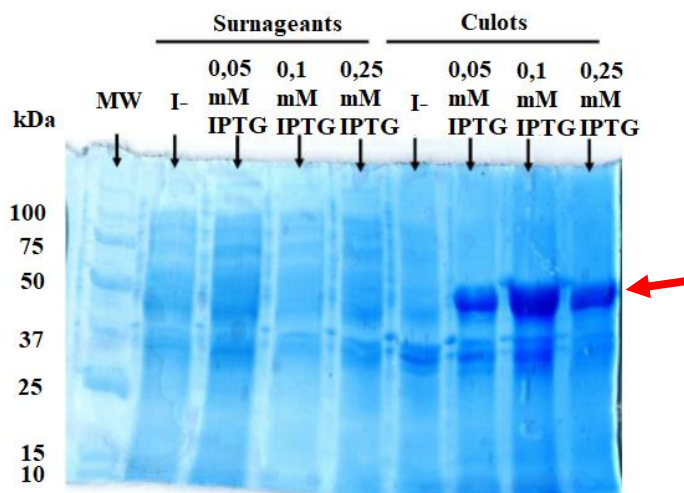


Figure 4.3 : Électrophorèse SDS-PAGE des mélanges protéiques issues des cultures d'*E. coli* Origami B (DE3) transformé avec le plasmide pET-15b/ sam-AA obtenus 24h après induction avec différentes concentrations d'IPTG. MW : Marqueur de taille (Unstained Precision Plus Protein Standards ; BioRad) ; I- : avant induction. La flèche rouge indique la position de Sam-AA exprimée.

Les extraits protéiques solubles issus de l'expression des différentes protéines chez *E. coli* Origami B(DE3) ainsi que ceux de la souche non transformée ont été analysés en termes d'activité hydrolytique de l' $\alpha$ - et de l' $\epsilon$ -acétyl-lysine afin d'évaluer l'activité spécifique et la régiosélectivité de Sam ELA et Sam AA recombinantes par rapport au mélange d'enzymes issu de la souche sauvage de *S. ambofaciens*.

#### 4.4.1.2 Evaluation de l'activité des extraits protéiques issus des souches d'*E. coli* Origami B(DE3) transformées

La réaction d'hydrolyse de l' $\alpha/\epsilon$ - acétyl-L-lysine a été utilisée pour l'évaluation de l'activité enzymatique. La détermination de l'activité de l'extrait protéique issu de la culture d'*E. coli* Origami B (DE3) non transformé, a montré la présence d'une activité hydrolytique endogène de l'acétyl-L-lysine (ACK) en particulier en présence de l' $\alpha$ -ACK. En effet, la présence de déacétylases réalisant la réaction d'acétylation chez *E. coli* qui intervient dans différents évènements (modification post-traductionnelle des protéines) a été largement décrite dans la littérature (Zhou et al., 2017 ; Hentchel, Escalante-Semerena, 2015).

Les résultats des analyses des hydrolyses réalisées en présence de l'extrait protéique issu de la culture d'*E. coli* Origami B(DE3) transformée avec le plasmide pET-15b / Sam-ELA ont

montré une activité hydrolytique vis-à-vis de l' $\epsilon$ -ACK. En effet, l'activité en présence de l' $\epsilon$ -ACK était beaucoup plus forte qu'en présence de l' $\alpha$ -ACK ce qui confirme la présence de Sam-ELA recombinante dans l'extrait protéique testé. Ce résultat valide également la présence et la spécificité de substrat de l' $\epsilon$  lysine acylase de *S. ambofaciens* décrite par Dettori et al., 2017. Les auteurs avaient décrit la perte d'une partie importante de l'activité hydrolytique de  $\epsilon$ -ACK après délétion du gène identifié in-silico comme codant l'expression d'une  $\epsilon$  lysine acylase similaire à celle identifiée chez *S. mobaraensis* par Koreishi et al., 2005b (Ferrari, 2014a). L'expression hétérologue de l' $\epsilon$  lysine acylase de *S. mobaraensis* (Sm-ELA) a déjà été reportée par Koreishi et al., 2009 en utilisant *Streptomyces lividans* TK24 comme hôte avec le vecteur d'expression pUC702. Cela avait permis la production hétérologue de Sm-ELA recombinante avec une activité similaire à celle purifiée à partir de la souche sauvage (Koreishi et al., 2009a). L'activité hydrolytique en présence de l'extrait protéique soluble issu de la culture d'*E. coli* Origami B(DE3) transformée avec le plasmide pET-15b / Sam-AA a été déterminée par l'hydrolyse de l'acétyl-L-lysine ( $\alpha$  ou  $\epsilon$ ). L'activité hydrolytique a été observée uniquement en présence de l' $\alpha$ -ACK où une rapide apparition de lysine a été mise en évidence, ce qui confirme la présence de Sam-AA dans l'extrait protéique utilisé. Dettori et al., 2018 ont démontré la présence d'une enzyme ayant une activité similaire à celle de Sm-AA de *S. mobaraensis*. La délétion du gène codant cette enzyme a montré une perte de 85% de l'activité hydrolytique de l' $\alpha$ -ACK (Dettori et al., 2017). La présence d'une enzyme qui catalyse la réaction d'acylation en position alpha a rarement été décrite dans la littérature, ce qui montre l'intérêt de l'utilisation de cette aminoacylase de *S. ambofaciens*. L'expression hétérologue de Sm-AA recombinante a déjà été réalisée chez *S. lividans* TK24 en utilisant le vecteur d'expression pSH19. L'enzyme recombinante avait montré une activité hydrolytique vis-à-vis de plusieurs N-acétyl-L-acide aminés supérieure à celle de l'enzyme issue de la souche sauvage (Koreishi et al., 2009b). Malgré l'absence de bande sur le gel SDS-PAGE de l'extrait protéique issue de la culture d'*E. coli* Origami B (DE3) – pET-15b / Sam-PVA, une détermination de l'activité a été réalisée. L'évaluation de l'activité de l'extrait a été effectuée par un test de synthèse du lauroyl-L-lysine, sachant que le test d'hydrolyse de l'acétyl-lysine n'est pas le plus adapté pour cette enzyme (Koreishi et al., 2006a). En effet, Sm-PVA décrite par Koreishi et al., 2006, est capable de synthétiser du N- $\alpha$ -lauroyl-L-lysine, ainsi que de la N- $\epsilon$ -lauroyl-L-lysine. Cependant, aucune apparition de produit n'a été mesurée dans notre cas, ce qui confirme la non expression de cette enzyme chez la souche transformée. L'absence d'expression de Sam-PVA issu du genre *Streptomyces*, chez *E. coli* pourrait s'expliquer par la conformation hétérodimérique de cette

enzyme. Cette dernière nécessite une maturation de la structure peptidique primaire, constituée d'un peptide signal d'excrétion et d'un peptide espaceur des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement. Torres-Bacete et al. (2015) avaient démontré que le résidu N-terminal de la sous unité  $\beta$  avait un rôle essentiel permettant d'assurer le mécanisme réactionnel de ces enzymes. D'où l'importance de la maturation de la structure peptidique primaire de Sam-PVA. Ces mêmes auteurs ont suggéré qu'*E. coli* n'est pas capable d'assurer cette maturation. Sachant que Sam-PVA est un hétérodimère, ce qui pourrait rendre complexe l'expression hétérologue de cette enzyme. Zhang et al., 2007 ont rapporté l'expression infructueuse des Pénicilline V acylase (PVA) issues de *S. mobaraensis* chez *E. coli* mais ils ont réussi à l'exprimer chez *S. lividans* (Zhang et al., 2007).

Le tableau 4.1 compare les activités hydrolytiques de l' $\alpha$  /  $\epsilon$  - acétyl-L-lysine des extraits bruts issus des cultures d'*E. coli* Origami B (DE3) transformés et non transformés. L'apparition de lysine au cours des réactions a été quantifiée par CLHP équipé d'un détecteur fluorimétrique suivant la méthode de dérivatisation des acides aminés en utilisant de l'orthophtaldéhyde. Les activités des différents extraits bruts issus des souches transformées d'*E. coli* Origami B (DE3) ont été comparés à ceux de la souche non transformée étant donné que celle-ci présentait également une faible activité hydrolytique des deux substrats. La fraction soluble de la culture d'*E. coli* Origami B (DE3) incorporant le plasmide pET-15b/ Sam-ELA présente une activité hydrolytique du N- $\epsilon$ - acétyl-L-lysine 30 fois supérieure à l'activité de la souche non transformée. L'activité spécifique de l'extrait brut issu d'*E. coli* Origami B (DE3) / pET-15b / sam-PVA n'a pas été quantifiée vu l'absence de produit visible sur CCM. Par ailleurs, la fraction soluble d'*E. coli* Origami B (DE3) / pET-15b/ Sam-AA montre une activité spécifique d'hydrolyse de N- $\alpha$ - acétyl-L-lysine 37 fois supérieure à l'activité de la souche non transformée. L'activité spécifique de cet extrait est très similaire à celle de l'extrait brut issu de *S. ambofaciens* ( $\approx 34$  nmole Lys / min . mg).

Tableau 4-1 : Activités spécifiques des extraits bruts des cultures d'*E. coli* Origami B (DE3) transformées et non transformée.

A.S (nmole Lys / min . mg)	Hydrolyse de l' $\alpha$ -acétyl-L-lysine	Hydrolyse de l' $\epsilon$ -acétyl-L-lysine
<i>E. coli</i> Origami B (DE3)	0,92	0,13
<i>E. coli</i> Origami B (DE3) / sam-ELA	0,26	3,71
<i>E. coli</i> Origami B (DE3) / sam-AA	33,24	0
<i>E. coli</i> Origami B (DE3) / sam-PVA	N.d	N.d

N.d : Non déterminé

Les résultats de l'évaluation de l'activité, en particulier ceux de Sam-AA recombinant, présentent un intérêt important dans une perspective d'étude structurale de l'enzyme par cristallographie. Cependant, cette dernière est jusqu'à présent en mélange avec d'autres protéines et molécules issus de l'hôte utilisé. A cet effet, la purification de cette enzyme est donc une étape impérative.

### 4.4.1.3 Purification de Sam-AA recombinante

La purification de Sam-AA recombinante a été réalisée par l'utilisation de la chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). En effet, le vecteur d'expression utilisé (pET-15b) permet l'ajout d'un motif poly-histidine en position N-terminale (partie du 6xHis). Ce dernier permet de faciliter la purification des protéines solubles exprimées chez *E. coli* transformé, par interaction de la queue poly-histidine avec les ions métalliques immobilisés sur la phase stationnaire, Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) dans notre cas. Après injection de l'échantillon dans la colonne, l'élution des molécules adsorbées s'est fait avec de l'imidazole à différentes concentrations (80 mM, 160 mM et 250 mM) contenu dans du tampon à pH 8 (25 mM Tris HCl, 50 mM NaCl). L'éluat a été ensuite ultrafiltré (membrane de 10 kDa) afin d'éliminer l'imidazole et les protéines ont été concentrées par précipitation à l'acétone à 80%. Le précipité de chaque élution a été séché, analysé par électrophorèse SDS-PAGE et son activité hydrolytique a été mesurée. Sur le gel d'électrophorèse (figure 4.4), une bande de très faible intensité est visible aux alentours de 55 kDa, suite à la première élution. Pour la deuxième et troisième élution, aucune bande n'a été visible sur le gel. Ceci est probablement dû à une faible rétention de l'enzyme recombinante par les ions métalliques. Le phénomène le plus répandu dans le cas de l'expression hétérologue de protéine avec un motif poly-histidines est la non disponibilité de ce dernier. En effet, il est possible qu'il soit inclus à l'intérieur de la structure après repliement de la protéine ou, encore, qu'il soit absent suite à une hydrolyse par les enzymes de l'hôte. Une saturation des sites d'interaction de la colonne par la forte concentration d'autres molécules présentes dans l'extrait protéique, telles des peptides contenant des résidus d'histidine ou d'autres protéines, peut aussi expliquer ce résultat. La mesure de l'activité hydrolytique de l' $\alpha$ -acétyl-lysine par les différents échantillons a confirmé les résultats de l'électrophorèse puisqu'une activité hydrolytique a été enregistrée dans l'échantillon issu de la première élution contrairement à ceux issus de la deuxième et de la troisième élution.



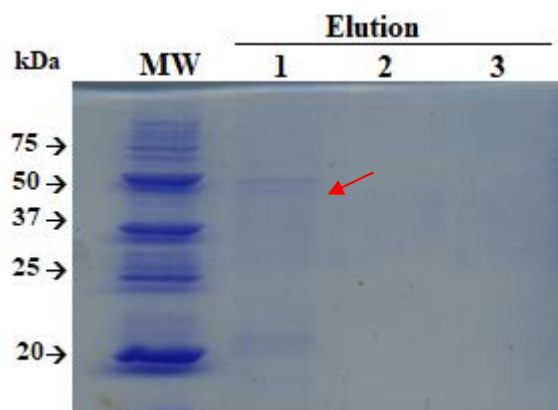


Figure 4.4 : Électrophorèse SDS-PAGE des protéines issues de l'éluion à différentes concentrations d'imidazole (éluion 1 : 80 mM, éluion 2 : 160 mM et éluion 3 : 250 mM). MW : Marqueur de taille (Unstained Precision Plus Protein Standards ; BioRad). La flèche rouge correspond à la bande de la taille de Sam-AA.

En conclusion, ce travail avait pour but d'évaluer l'expression hétérologue des différentes aminoacylases de *S. ambofaciens* chez *E. coli* Origami B(DE3) en utilisant le plasmide pET-15b comme vecteur d'expression. Les résultats ont démontré l'expression de Sam-ELA et Sam-AA avec le système choisi. Les enzymes recombinantes ont présenté des sélectivités cohérentes avec celles attendues. Par contre, Sam-PVA n'a pas pu être exprimée. Néanmoins, une forte proportion des enzymes est produite sous forme de corps d'inclusion. Cela présente un inconvénient majeur. Afin de compléter cette étude, il semble très important de revoir le protocole d'expression de ces enzymes afin de minimiser les risques d'apparition de corps d'inclusion. L'optimisation des conditions de culture et/ou des performances des cellules hôtes doit être envisagée afin d'adapter la machinerie cellulaire à la production des enzymes cibles sous forme soluble (Singh, Panda, 2005 ; Sørensen, Mortensen, 2005 ; Arya et al., 2015). Une approche possible serait de resolubiliser les corps d'inclusion et renaturer les enzymes produites sous cette forme.

#### 4.4.2 Comparaison des performances catalytiques entre des extraits bruts d'une souche mutante n'exprimant que Sam-AA et de la souche sauvage de *S. ambofaciens*

L'expression des aminoacylases de *S. ambofaciens* nécessitant une amélioration du système d'expression afin de réduire la formation de corps d'inclusion et de faciliter la récupération des enzymes, en particulier Sam-AA, une deuxième approche a été suivie afin d'étudier Sam-AA séparément des autres aminoacylases du mélange. Le travail présenté dans le chapitre 4-2 a été réalisé en utilisant l'extrait brut de la souche sauvage de *S. ambofaciens* semi-purifié contenant quatre aminoacylases (Sam-AA, Sam-AA like, Sam-ELA et Sam-PVA). Parmi les quatre

acylases, Sam-AA a été décrite comme responsable de plus de 80 % de l'activité hydrolytique de l' $\alpha$ -acétyl-lysine, ce qui suggère qu'elle est aussi responsable de l'acylation des acides aminés et peptides en position alpha (Ferrari, 2014a). Afin de comparer les performances catalytiques de Sam-AA avec celles de l'extrait brut de la souche sauvage, une souche mutante de *S. ambofaciens* chez laquelle les gènes codant pour Sam-ELA et Sam-PVA ont été délétés, a été construite. Cette souche mutante a été cultivée dans les mêmes conditions que la souche sauvage. Les mêmes protocoles de semi-purification de l'extrait brut ont été appliqués. La spécificité de substrat et la régiosélectivité de l'extrait protéique envers les acides aminés et les acides gras a ensuite été évalué.

L'activité spécifique de l'extrait protéique issu de la souche mutante et la souche sauvage a été évaluée en réalisant la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide laurique dans les mêmes conditions (0,1 M des deux substrats dans du tampon tris HCl 25 mM, 50mM NaCl pH 8 à 45°C, agitation à 500 rpm contenant 1 g/L de protéines). Le suivi cinétique des réactions montre une activité spécifique initiale légèrement moins importante de l'extrait protéique issu de la souche mutante (2.2 mM/h/mg protéine) par rapport à l'extrait protéique issu de la souche sauvage (2.7 mM/h/mg protéine) (figure 4.5). Cette différence d'activité pourrait être liée à l'absence de Sam-PVA qui a été décrite comme capable de catalyser l'acylation des acides aminés avec l'acide laurique (Koreishi et al., 2006a).

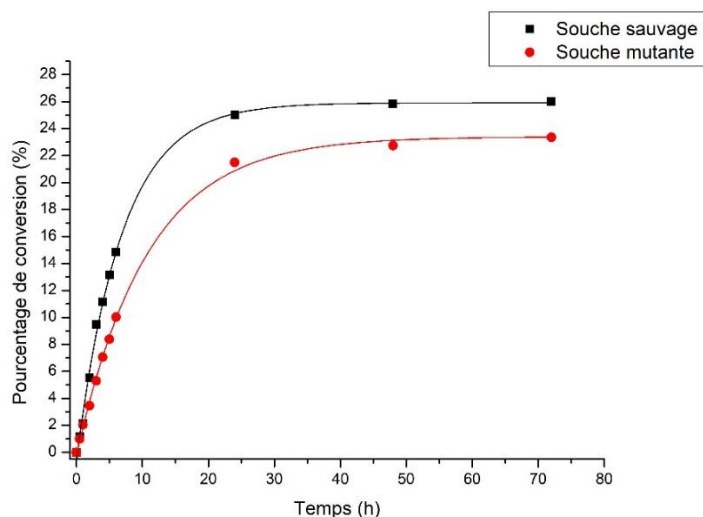


Figure 4.5 : suivi cinétique de la réaction de synthèse de l' $\alpha$ -lauroyl-lysine en présence de l'extrait protéique issu de la souche sauvage et mutante. Réaction réalisée dans du tampon tris HCl 25 mM, 50mM NaCl pH 8 à 45°C, agitation à 500 rpm contenant 0.1 M des deux substrats et 1 g/L de protéines

#### 4.4.2.1 Evaluation et comparaison de la spécificité de substrat envers les acides aminés

L'évaluation de la spécificité de substrat des extraits protéiques de la souche sauvage et mutante envers les acides aminés a été réalisée en utilisant l'acide 10-undécénoïque comme donneur d'acyle. L'analyse par HPLC de l'acide gras résiduel au cours de la réaction a permis de montrer que le profil de spécificité de substrat envers les 20 acides aminés était similaire entre les deux souches avec uniquement quelques différences en termes de taux de conversion (figure 4.6). En effet, dans les deux cas, l'analyse des produits de la réaction par LC-MS-MS a permis de confirmer la N-acylation de l'amine en position alpha des acides aminés sauf en présence de la proline, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique, pour lesquels aucun produit n'a été détecté. Pour l'histidine, la tyrosine et le tryptophane l'absence de produit peut aussi être expliquée par leur faible solubilité dans les conditions expérimentales. Pour la proline, l'absence d'acylation peut être liée à la présence d'amine secondaire uniquement. L'absence de réaction pour les acides aminés polaires chargés négativement peut-être liée à la présence d'un groupement carboxylique au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale de l'acide aspartique et l'acide glutamique. Cette hypothèse a été confirmée par l'évaluation de l'activité enzymatique en utilisant des molécules présentant ou pas un groupement carboxylique (acide 6-aminohexanoïque et 6-aminohexanol) (chapitre 4.2). Les deux extraits protéiques présentent des taux de conversion très similaires sauf en présence de valine, leucine, d'isoleucine et de thréonine avec des taux de conversion moins importants lors de l'utilisation de l'extrait protéique de la souche mutante par rapport à la souche sauvage (figure 4.6). Ces résultats peuvent être liés à l'absence de Sam-PVA dont le gène a été délété.

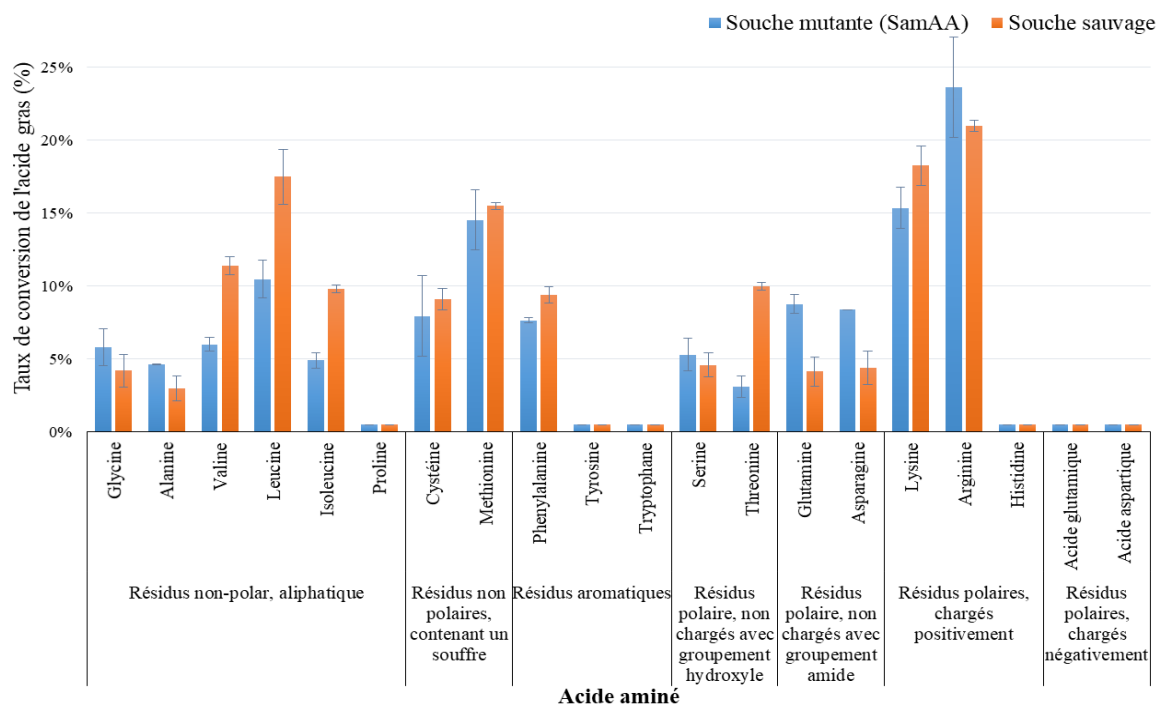


Figure 4.6 : pourcentage de conversion de l'acide 10-undécénoïque en présence des 20 acides aminés. Réaction réalisée pendant 24 h dans du tampon tris HCl 25 mM, 50 mM NaCl pH 8 à 45°C, agitation à 500 rpm contenant 0,1 M des deux substrats et 1 g/L de protéines (n=2)

#### 4.4.2.2 Comparaison de la spécificité de substrat envers les acides gras

L'évaluation de la spécificité envers les acides gras a été réalisée en utilisant la lysine comme accepteur d'acyle afin de pouvoir vérifier si la régiosélectivité est identique quelle que soit la longueur de la chaîne de l'acide gras. Pour les deux souches étudiées les taux de conversion les plus importants ont été obtenus en présence de l'acide 10-undécénoïque et de l'acide laurique alors qu'un faible taux de conversion a été obtenu en présence de l'acide oléique (figure 4.7). Par ailleurs, une différence très importante de taux de conversion a été observée en présence de l'acide octanoïque. En effet, avec l'extrait protéique brut de la souche sauvage, les deux produits acylés correspondant à l'acylation de la fonction amine en position alpha et en position epsilon de la lysine ont été obtenus. Dans le cas de la réaction en présence de l'extrait protéique contenant uniquement Sam-AA, un seul produit correspondant à l'acylation de l'amine en position alpha a été observé, on ne retrouve que des traces du composé acylé en position epsilon (taux de conversion inférieur à 0,5%).

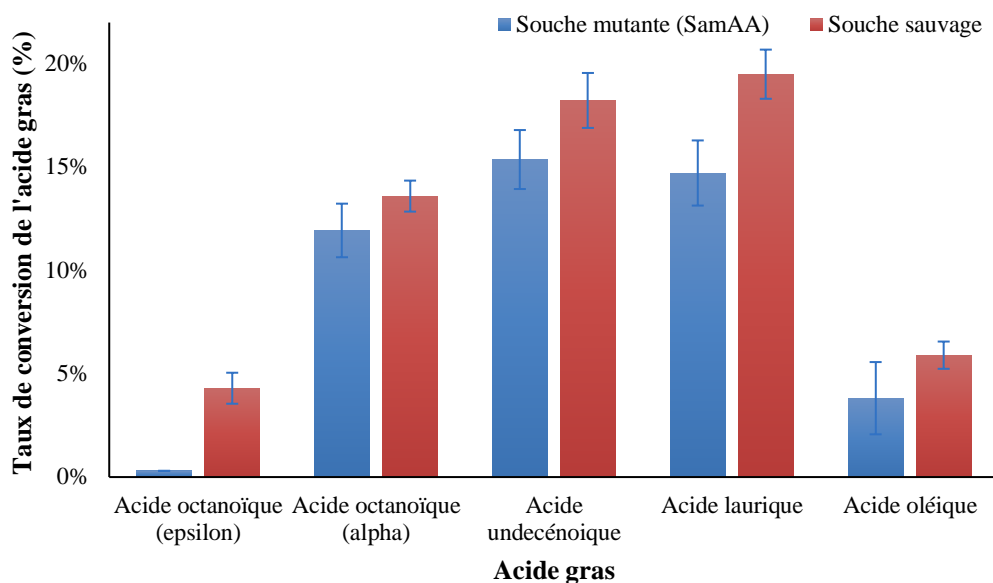


Figure 4.7 : pourcentage de conversion d'acides gras en présence de la lysine comme accepteur d'acyle. Réaction réalisée pendant 24 h dans du tampon tris HCl 25 mM, 50 mM NaCl pH 8 à 45°C, agitation à 500 rpm contenant 0,1 M des deux substrats et 1 g/L de protéines

La régiosélectivité des aminoacylases provenant des deux souches (mutante et sauvage) lors de l'acylation de la lysine avec l'acide octanoïque a été confirmée par analyse LC-MS-MS. Dans le cas de la souche sauvage, deux produits possédant la même masse sont élués avec un intervalle de temps d'environ 1,5 min. La fragmentation du produit élué à 7,36 min produit l'ion fils 210 m/z correspondant à [la masse du produit - COOH - H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup> comme ion majoritaire. Cette fragmentation est significative d'une acylation en position epsilon étant donné que l'acide carboxylique est moins protégé que dans le cas d'une acylation en position alpha. Le deuxième produit à 5,79 min génère l'ion fils 237 m/z correspondant à [la masse du produit - 2H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup> comme ion majoritaire ce qui signifie que l'acylation de la lysine a été réalisée en position alpha (figure 4.8.1.A). Le même profil a été obtenu lors de l'analyse LC-MS-MS du produit de la réaction d'acylation de la lysine avec l'acide octanoïque catalysée en présence de l'extrait protéique de la souche mutante (figure 4.8.1.B). Cela confirme la régiosélectivité de Sam-AA vis-à-vis de la position alpha de la lysine et la contribution de Sam-ELA dans l'apparition du produit acylé en position epsilon (Ferrari, 2014a ; Dettori et al., 2018b). Afin de valider ce résultat, l'acide phénylpropionique a été utilisé comme donneur d'acyle. En présence de l'extrait protéique provenant de la souche sauvage, deux produits acylés en position alpha ou epsilon, facilement séparables par HPLC avec une colonne hydrophobe (C18) ont été synthétisés. Avec l'extrait de la souche mutante, un seul produit acylé en position alpha a été obtenu (figure 4.8.2). Ces résultats permettent de valider l'hypothèse d'une acylation en position epsilon liée à la présence de Sam-ELA et à une faible sélectivité de Sam-AA vis-à-

## Chapitre IV : Performances des acylases pour la réaction d'acylation des acides aminés

vis des acides gras à courtes chaînes. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Koreishi et al. (2005b). Ces derniers ont décrit le potentiel catalytique de l' $\epsilon$  lysine acylase de *S. mobaraensis* en réalisant la réaction d'acylation en présence de plusieurs acides gras, et ont montré une diminution de l'activité de cette enzyme en réduisant la longueur de la chaîne de l'acide gras. En effet, en présence d'acides gras tels que l'acide laurique un taux de conversion de 100% a été mesuré alors que 58.7 % de conversion ont été obtenus en présence de l'acide octanoïque (Koreishi et al., 2005b). Cela n'est pas le cas lorsque l'extrait protéique de la souche sauvage de *S. ambofaciens* a été utilisé. En effet, l'apparition de produits acylés en epsilon a été observée quand des acides gras à courtes chaîne ont été utilisés. Aucun produit acylé en position epsilon n'a été identifié en présence d'acide gras d'une longueur supérieur à huit carbones. Cela pourrait signifier que la spécificité de substrat entre les epsilon lysine acylases de *S. mobaraensis* et de *S. ambofaciens* sont différentes malgré leur importante homologie de séquence (80 %).

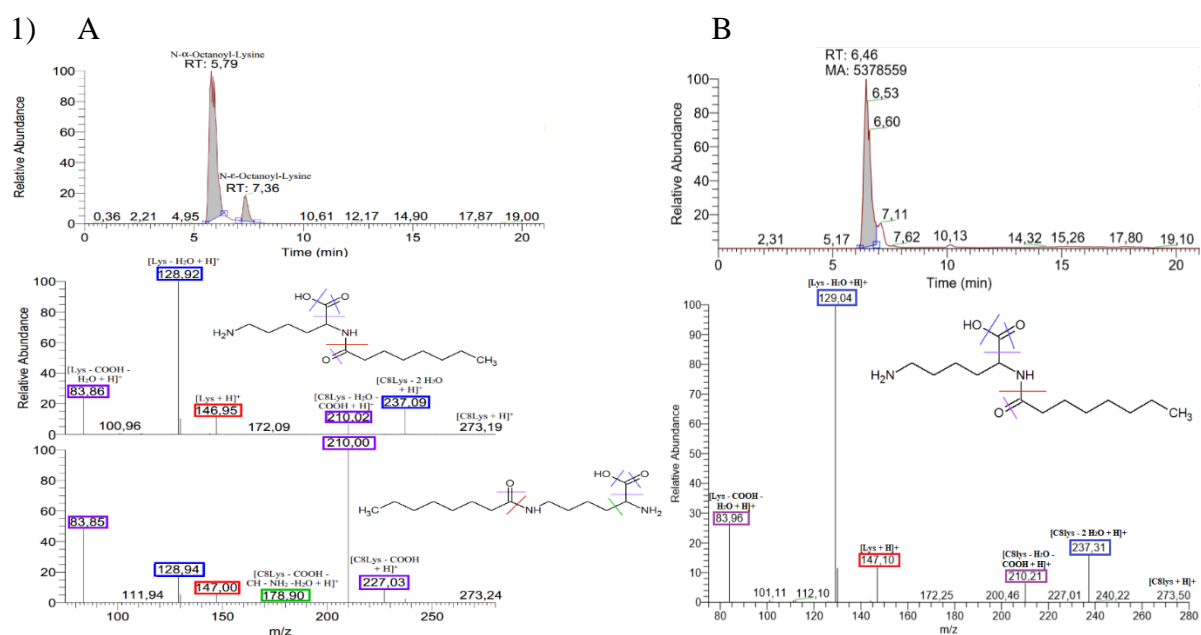


Figure 4.8 : suivi et spectre MS2 après fragmentation de l'acyl-lysine : A: souche sauvage de *S. ambofaciens* ; B : souche mutante de *S. ambofaciens*, pour la synthèse de (1) l'octanoyl-lysine ou (2) phénylpropionyl-lysine

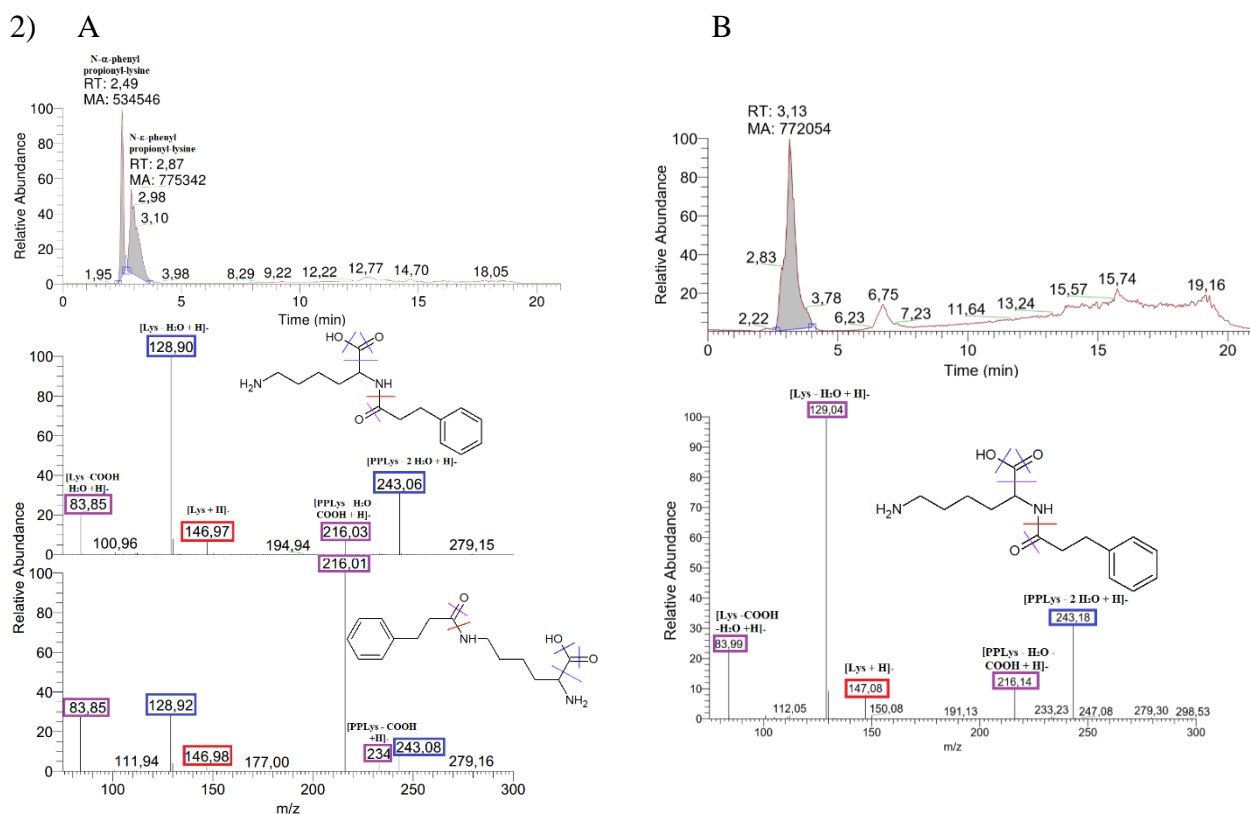


Figure 4.8 (suite) : suivi et spectre MS2 après fragmentation de l'acyl-lysine : A: souche sauvage de *S. ambofaciens* ; B : souche mutante de *S. ambofaciens*, pour la synthèse de (1) l'octanoyl-lysine ou (2) phénylpropionyl-lysine

## 4.5 Conclusion

Suite aux faibles performances obtenues lors de l'acylation enzymatique des acides aminés par la lipase B de *C. antarctica*, l'utilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* pour cette réaction a été évaluée. Ces enzymes ont été décrites dans une étude antérieure pour leur capacité à catalyser la réaction de N-acylation de la lysine sur l'amine en position alpha mais aucune donnée sur leur sélectivité envers les donneurs d'acyle et les accepteurs d'acyle n'avait été décrite. A cet effet, l'évaluation des performances catalytique de ces enzymes pour la N-acylation des 20 acides aminés protéinogénique a été réalisée en présence d'acide undécénoïque. Les aminoacylases de *S. ambofaciens* ont permis l'acylation de la majorité des accepteurs d'acyle avec de meilleures performances en présence des acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) ainsi que de leucine et de méthionine. Tous les acides aminés ont été acylés sur l'amine de la chaîne principale sans apparition de produit secondaire lié à l'acylation des groupements de la chaîne latérale. La sélectivité de ces enzymes envers différents donneurs d'acyle a aussi été déterminée. Les résultats ont montré un accroissement de l'activité avec l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse jusqu'à 12 carbones puis

une diminution de l'activité. Les analyses en LC-MS-MS ont montré un changement de régiosélectivité de ces enzymes lorsque des acides gras de moins de 8 carbones sont utilisés. Afin de vérifier si cela était lié à la présence de Sam-ELA qui catalyse la réaction de N-acylation de la lysine en position epsilon, un extrait enzymatique issu d'une souche de *S. ambofaciens* pour laquelle les gènes codant pour Sam-ELA et Sam-PVA ont été délétés a été utilisé dans les mêmes conditions. Cela a permis de confirmer la contribution de Sam-ELA dans l'acylation de la lysine en position epsilon en présence d'acides gras à courtes chaînes. L'influence des ions divalents dans l'activité enzymatique a aussi été déterminée, mettant en évidence l'effet activateur du cobalt sur l'activité des aminoacylases de *S. ambofaciens*. Afin de pouvoir étudier séparément les différentes aminoacylases, l'expression hétérologue de ces enzymes dans une souche d'*E. coli* a été réalisée. Différentes souches d'*E. coli* ont été obtenues, capables de produire les aminoacylases Sam-AA et Sam-ELA, dont la régiosélectivité respective a pu être confirmée. Cependant, ces enzymes sont présentes sous forme soluble en faible concentration en raison de la formation majoritaire de corps d'inclusion. L'utilisation de ces souches pour la production de Sam-AA pure n'est pas envisageable. A cet effet, la production des différentes aminoacylases par expression hétérologue dans d'autres souches et/ou en utilisant d'autres vecteurs d'expression pourrait être envisagée dans de futures études. Ainsi, l'utilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* issues de la souche sauvage ou mutante reste, à ce jour, la meilleure alternative pour la N-acylation des acides aminés.

Afin d'intensifier la réaction de N-acylation des acides aminés et de développer un procédé vert compétitif et économique, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Parmi les méthodes d'intensification des réactions enzymatique les plus utilisées se trouve l'utilisation des réacteurs à lit fixe mettant en œuvre des enzymes immobilisées. A cet effet, l'évaluation de l'immobilisation des enzymes, en particulier des aminoacylases de *S. ambofaciens*, a constitué l'une des tâches les plus importantes de cette thèse. La mise en place d'un procédé d'immobilisation des enzymes et l'évaluation de leurs performances après immobilisation font l'objet du chapitre 5.



CHAPITRE V : ÉVALUATION DES PERFORMANCES DES  
AMINOACYLASES DE *STREPTOMYCES AMBOFACIENS*  
IMMOBILISÉES

---



## **5 Chapitre V : Evaluation des performances des aminoacylases de *Streptomyces ambofaciens* immobilisées**

### **5.1 Introduction**

Lors du chapitre précédent, les performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* ont montré leurs très prometteuses capacités pour catalyser la réaction de N-acylation d'acides aminés, comparativement aux lipases. Cependant, l'utilisation de ces enzymes est limitée par leur faible stabilité au cours du temps, le suivi cinétique montrant un arrêt de la réaction après environ 24 h d'incubation. Cela peut être principalement relié à une dénaturation thermique irréversible de l'enzyme et / ou à une inhibition par le substrat et / ou le produit de la réaction. Afin de remédier à cela, l'immobilisation de ces aminoacylases peut permettre une amélioration de leur stabilité thermique et de réaliser des réactions en continu par l'utilisation d'enzymes immobilisées en réacteur à lit fixe permettant d'éviter l'accumulation de produit en contact avec l'enzyme et de recycler le biocatalyseur. L'utilisation de matériaux à base de silice, tel que SBA15, a été largement décrite dans la littérature pour l'immobilisation d'enzymes (Wang, Caruso, 2005 ; Brühwiler, 2010 ; Hartmann, Kostrov, 2013b). Ces supports présentent de nombreux avantages, en particulier liés à la présence de groupements hydroxyle facilitant le greffage de molécules fonctionnelles pouvant améliorer l'affinité des enzymes vis-à-vis du support (cas de la physisorption) ou la fixation covalente de l'enzyme sur le support (cas de la chimisorption). Dettori et al., 2018 ont évalué les performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* immobilisées sur SBA15 par physisorption (sans modification en surface) et par chimisorption (utilisation du glutaraldéhyde et du glycidyle ou glymo comme agent greffant). Ils avaient montré que les aminoacylases perdaient la quasi-totalité de leur activité après immobilisation par chimisorption contrairement à la physisorption où une activité résiduelle correcte était maintenue. Cependant, lors du recyclage du biocatalyseur, une importante désorption de l'enzyme avait été observée (Dettori et al., 2018). C'est pourquoi, lors de notre étude, la physisorption des aminoacylases a été réalisée sur SBA 15 avec et sans modification en surface, par greffage du (3-aminopropyl) triéthoxysilane (APTES) à différentes concentrations permettant d'augmenter, selon le pourcentage, le caractère hydrophobe des supports. D'autre part, la taille des pores des supports poreux peut aussi influencer considérablement le transfert de matière externe du substrat et du milieu réactionnel vers l'enzyme. C'est pourquoi des supports méso-macroporeux ont été également utilisés et traités de la même manière que les supports mésoporeux (SBA15) (Kim et al., 2015). Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication soumise au journal « Colloids and surfaces B : biointerfaces ».

## **APTES modified SBA-15 and meso-macroporous silica materials for the immobilization of aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens***

Mohamed Chafik Bourkaib<sup>a</sup>, Pierrick Gaudin<sup>b</sup>, Yann Guiavarc'h<sup>a</sup>, Stephane Delaunay<sup>a</sup>, Xavier Framboisier<sup>a</sup>, Catherine Humeau<sup>a</sup>, Isabelle Chevalot<sup>a</sup>, Jean-Luc Blin<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> : LRGP, UMR 7274 CNRS-Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, F-54518, VANDŒUVRE CEDEX, France

<sup>b</sup> : Université de Lorraine/CNRS, L2CM, UMR7565, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

### **Abstract:**

The use of enzyme for the production of biomolecules is increasingly coveted but their industrial implementation is limited by the cost of this biocatalyst which is non-recyclable when used in free form. Crude extracts from *Streptomyces ambofaciens* exhibiting aminoacylases activities were recently described as very attractive for the synthesis of amino acids biobased surfactants. It consists in a mixture of four acylases among which an aminoacylase presents the amino acids N-acylation activity desired. However, these enzymes suffer from thermal instability and are negatively influenced by the amino-acyl product of the reaction. Consequently, the immobilization of these enzymes presents a promising way to overcome these issues. The aim of the present study is to investigate the influence of the porosity of the silica support and of its functionalization by 3-aminopropyl-tri-ethoxysilane (APTES) on the immobilization and activities of these aminoacylases. To reach this goal, two porous silica supports were compared: a mesoporous (SBA-15) and of meso-macroporous (MMS) silica material. The behaviour of both supports after enzyme adsorption was compared without and with functionalization with APTES. The results show that the enzyme immobilization on non-functionalized support (without APTES) at pH=8 leads to a poor enzyme loading due to electrostatic repulsion between the enzyme and the silica support. Moreover, these non-functionalized materials suffer from a significant leaching from the first utilisation. The APTES functionalization of the silica materials allow a better enzyme loading by favouring enzyme-support interactions. For both materials, the results show an increase of the immobilization rate by increasing the APTES functionalization rate from 0 to 10%, then a plateau is reached likely due to surface saturation with APTES around 10% grafting rate. A higher immobilized enzymes amount is obtained by using MMS instead of SBA-15, which is assigned to a better enzyme diffusion in the meso-macroporous structure of the MMS along the immobilization procedure.

However, the measurement of the hydrolysis and synthesis catalytic performances of materials shows a significant improvement of the conversion rate by increasing the APTES percentage in the case of SBA-15 while the activity of the immobilized enzymes on the functionalized MMS is not influenced by the APTES ratio. This behaviour can be explained by the better enzyme accessibility on SBA-15-based materials where the enzyme is mainly located on the external surface area of the materials. The APTES grafting slows down the enzyme leaching phenomenon as compared to non-functionalized supports, although the phenomenon still occurs after several recycling. The cross linking of the aminoacylases by using glutaraldehyde at different percentages leads to a loss of the activity due to enzyme inactivation by glutaraldehyde. Finally, the results of the evaluation of the synthesis behaviour of the immobilized enzyme show the same trends as those observed with hydrolysis. The LC-MS-MS analysis shows that the regioselectivity of the enzymes after immobilization is not modified.

### **Introduction:**

Acylation reactions are largely used at industrial scale for the synthesis of food, pharmaceuticals and cosmetic ingredients from natural resources [1]. Among them, bio-based surfactants, more especially amino acids surfactants (AAS), are ones of the most attractive due to their eco-compatibility, good techno-functional properties and, for some of them, attractive bioactivities which makes them molecules of choice for several industries. However, these molecules are industrially produced by chemical synthesis, especially by the Schotten-Baumann chemical reaction, requiring the use of functional group protection or activation what results in the production of large quantity of effluents which need to be reprocessed in order to reduce the environmental impact [2,3]. One of the most attractive alternatives to the chemical processes is the use of enzymes to perform these reactions under mild conditions and without using and generating hazardous molecules for the environment. For this reason, a wide range of enzymes has been used in different industries (cosmetics, detergents, biofuels, pharmaceuticals...) [4]. Several microbial enzymes were already described as able to perform the N-acylation reaction of amino acids in water without any protection/unprotection steps and with different regio- and chemo-selectivities allowing the control of the reaction. For these reasons, the enzymatic synthesis appears to be of great interest for the development of green and sustainable processes [5–8]. However, their protein nature makes them brittle outside their natural cellular environment where it exerts such activity [9]. Indeed, the lack of long-term operational stability and the difficulty to reuse the free enzyme, in addition of their high costs, reduce the economic interest of such processes and hamper the development of industrial enzymatic production

methods [10,11]. Several strategies can be used to improve the stability of the enzyme. The first method is the protein engineering by substitution of some amino acids residues in order to improve the structural stability towards the operational conditions (pH, temperature, pressure ...). However, it does not facilitate the reuse of the enzyme. The immobilization of the enzyme on an inert solid material might lead to an improvement in the operational life and easy recycling of the enzyme [12]. The immobilization depends on the material characteristics, the immobilisation techniques and conditions, so there is no standard immobilisation method suitable for all types of enzymes [13].

The selection of the most suitable material is crucial when developing immobilization process [14]. A large variety of materials exhibiting different physicochemical characteristics have been developed for enzyme immobilization [15–17]. Among them, inorganic supports, especially the porous silica gels are the most used material due to their eco-compatibility, availability and low cost with an easy and controllable synthesis. The presence of silanol groups makes easy the immobilization and the surface modification of the material by grafting functional groups through silylation what allows the modulation of the surface physicochemical characteristics [18]. Ordered mesoporous silica, especially Santa Barbara Amorphous 15 (SBA-15) support, are widely used for enzyme immobilisation due to their good stability to the operational conditions, hydrophilic property, high surface area (300-1500 m<sup>2</sup>/g), regular and easily controllable pore diameters (2-40 nm), which are compatible with the enzyme diameters, and high pore volume (around 1 mL/g) [10,17,19]. The pore size of the support is one of the most important parameters in enzyme immobilization. It is well known that closer the pore size of the support to the diameter of the enzyme is, better is the immobilization performance due to a better conformational stability and less structure modification possibilities of the adsorbed enzyme in the pores while preventing the leaching phenomenon [20–22]. However, the incorporation of macropores in such supports can improve the immobilization process by decreasing mass transfer limitations by acting as transport channels of the enzyme to the mesopores [23]. Indeed, these hierarchical porous materials combine the advantage of macroporous structures leading to less diffusional limitations (pores bigger than 50 nm) while maintaining high specific surface areas and the ones of the mesoporous materials which exhibit more adapted pores size and high porous volume [24–26]. Those properties might significantly increase enzyme loading [21,27].

The immobilisation method can also significantly influence both the activity and the stability of the enzyme. The immobilization strategies can be classified according to the interaction

mode between the enzyme and the support. Chemical immobilization is based on the formation of covalent bond (amide or ester bond) between an amino acid residue at the surface of the enzyme, in particular with lysine side chain amino group, and an organic moiety grafted at the surface of the material like glutaraldehyde (GA) and isocyanate. The covalent immobilization can lead to a better stiffening of the enzyme at the surface of the support, preventing desorption and allowing a better recycling of the enzyme but with high probability to reduce or loss the activity of the enzyme due to multipoint attachments of the amino acids residues close to the active side on the support. This can lead to a conformational change of the enzyme or diffusional limitations of the substrates to the active site [28]. At the opposite, physical immobilisation (physisorption, entrapment, and encapsulation) is based on the use of low interaction modes (hydrogen, hydrophobic, electrostatic and Van der walls interactions) [29,30]. This can lead to structural preservation of the native 3D conformation of the enzyme, depending on the surface properties of the material, that allows maintaining the enzyme initial catalytic properties [31]. In addition, this immobilisation methodology is simple, rapid and cheap without using any functionalized material nor toxic solvents. For this reason, this kind of immobilization technique is of great interest for immobilized enzyme-based processes. However, due to weak attachment of the enzyme to the support, there is a high probability to have an enzymatic desorption from the latter during the catalytic reaction due to reaction conditions or through mechanical shear forces [32]. In order to overcome this scientific bottleneck, surface property modification by grafting alkylsilanes on the hydroxyl groups of the support surface was described as improving the immobilization performances [33]. The immobilization rate and the stability of the enzyme are influenced by the pH, the temperature, the size of the pores and of the enzyme and the surface properties of those later. In addition, these parameters affect the orientation of the enzyme that can lead to a decrease of reactant mass transfer into the active site when the enzyme is fixed on the active site entrance cavity [34]. Indeed, the ionic interactions are closely related to the pH of the medium, which governs the surface charges of both enzyme and support. As a result, the adsorption equilibrium of the protein is closely dependent on the pH [35]. Wang and Caruso [21] evaluated the immobilization of different enzymes on spherical mesoporous silica materials at pH 7. Given that the pI of the supports is around 3, they demonstrated that enzymes with higher pI like lysozyme are widely immobilized and more stable compared to the ones with pI lower than 7 like catalase. This was attributed to favorable electrostatic interactions between the enzyme and the substrate at such pH [21]. The presence of hydroxyl groups at the surface of the silica material can disadvantage the enzyme adsorption on the support. Indeed, the usual pH condition of an enzyme like acylase (around 7)

is generally higher than its pI, leading to enzyme and support both being negatively charged. This results in a repulsion phenomenon and a significant decrease of the enzyme loading even if there is some Van der Waals and hydrophobic interactions [36]. The grafting of organosilane, like 3-aminopropyl-tri-ethoxysilane (APTES) and 3-aminopropyl-dimethyl-ethoxysilane (APDMES), on the support might change the electrostatic equilibrium and introduce other kind of low interactions such as hydrogen and hydrophobic interactions which might improve the immobilization rate [37]. Zhao et al. [38] immobilized penicillin acylase (PA) on SBA-15 functionalized with different organosilanes. They demonstrated that the surface functionalization allowed higher adsorption of the enzyme due to an increase of the surface hydrophobicity and a decrease of the electrostatic repulsions. They also showed that APTES was the most suitable grafting agent for enzymatic activity compared to other organosilanes [38]. Indeed, the material surface hydrophobicity clearly influences the immobilization process and the activity of the immobilized enzyme. However, a highly hydrophobic surface can lead to a significant decrease the enzyme activity by affecting the structural conformation of the latter. Many authors investigated the influence of the support characteristics on the structural configuration of the enzymes [35,36,39–41]. Sang et al. [35] evaluated the structural change of lysozyme and myoglobin immobilized on SBA-15 (hydrophilic surface) and propyl-functionalized SBA-15 (hydrophobic surface) with controlled pore size. They demonstrated that the enzymes presented the better activity when immobilized on SBA-15 with pore size close to the enzyme diameter. By analyzing the trend of amide I and II bands ratio using ATR-FTIR spectroscopy, they showed that there is no change of the secondary structure of the enzyme when immobilized on hydrophilic surface compared to the free enzyme unlike the ones immobilized on hydrophobic surface where a significant change was observed, suggesting a disruption of the protein conformation [35]. [41] investigated, by molecular simulation, the stability of the alcohol dehydrogenase (ADH) when immobilized on hydrophobic methacrylate and hydrophilic SBA-15 supports. They demonstrated that the enzyme exhibits an enhanced activity when immobilized on hydrophilic supports due to its structural stability and well orientation unlike the use of highly hydrophobic materials where a loss of structural conformation was observed. The enzyme activity remains stable when immobilized on weakly hydrophobic surface which was the same case by using hydrophilic and hydrophobic SBA-15. Belfort et al. [42] completed the precedent study by studying the activity of ADH immobilized on weakly hydrophilic SBA-15 and highly hydrophilic support NH<sub>2</sub>-SBA-15. Their results show a complete loss of the activity of the immobilized enzyme on NH<sub>2</sub>-SBA-15 due to higher hydrogen-bonding interactions which increase the surface energy, leading to an instability of



the protein by inter-protein interactions. Furthermore, Shah et al. [43] investigated the influence of the pH on the immobilization of Penicillin G acylase (PGA) on APTES functionalized SBA-15. They demonstrated that the pH of immobilization below or above the isoelectric point of the enzyme (pI of PGA around 8.1) leads to electrostatic repulsion due to the positive or negative net charge of the enzyme resulting in the decrease of the enzyme loading. However, a high increase of the amount and the stability of the immobilized enzyme was observed when the pH is close to the pI (net charge of the protein around zero). The activity of the immobilized enzyme is close (92%) to the one of the free enzymes, showing that the enzyme is properly oriented [43]. Finally, Jesionowski et al. [37] immobilized the acylase I from *Aspergillus melleus* on APTES and glutaraldehyde (GA) functionalized and non-functionalized Stöber silica. They also showed the efficiency of the APTES functionalization of the silica support where the enzyme retains 62 % of its activity compared to non-functionalized and GA-functionalized support (42 and 23 % respectively). They suggested that the loss of the activity is due to unfavorable interactions and the formation of covalent bonds when using GA while APTES improved the immobilization and the activity by increasing hydrogen and hydrophobic interactions. To sum up, the influence of the surface properties on the activity depends on the enzyme nature but the use of APTES as organosilane appears to be the most suitable to maintain acylase activity compared to other organosilanes.

The acylation of amino acids with fatty acids using immobilized enzyme has been already described by different authors using lipases or proteases in non-aqueous media; however, the use of immobilized acylases for this reaction was rarely described [32,44,45]. In a recent work, the exceptional ability of the aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* to perform the reaction of N-acylation of the amino acids on their alpha amino group was described in the perspective of green synthesis of amino acids-based surfactants [46]. These enzymes consist in a mixture of four acylases with different specificities: the epsilon lysine acylase (Sam ELA) specific to the acylation and deacylation of lysine on the side chain amino group, penicillin V acylase (Sam PVA) specific to the acylation of lauroylated amino acid and two aminoacylases (Sam AA and Sam AAlake) specific to the acylation and deacylation of amino acids on the alpha amino group and responsible of almost all the  $\alpha$ -acylation activity [7,46]. However, these aminoacylases present low thermal stability in their free form, suggesting the possible benefit of their immobilization. Dettori et al. [32] immobilized these enzymes by physical and chemical methods using glutaraldehyde and glycidyle functionalization on SBA-15 and investigated their activity and stability [32]. They demonstrated that the covalently immobilized enzymes lost

almost all their activity (around 5% relative activity was kept) unlike the physically immobilized enzymes (around 23% relative activity was preserved). However, by recycling the enzyme immobilized on SBA-15, a significant leaching of the adsorbed protein was observed due to the weak interactions with the support.

Given that the immobilization and the reaction processes are strongly dependent on both the porous structure (enzyme diffusion during the immobilization step) and the surface hydrophilic/hydrophobic (enzyme-support interactions) of the support, the present work aims at investigate the influence of the porosity of two silica supports and of their functionalization by 3-aminopropyl-tri-ethoxysilane (APTES) on the immobilization and activities of the aminoacylases from *S. ambofaciens*. Two porous silica supports were compared: a mesoporous (SBA-15) and a meso-macroporous (MMS) silica material. In order to tune their surface hydrophobicity [47], the grafting rate of APTES on both silicas supports was varied from 0% to 50% mol.%. The enzyme immobilization step and activity performances of the resulting material were investigated for both mesoporous SBA-15 and meso-macroporous (MMS) silica, with and without APTES functionalization.

## **Materials and methods**

Pluronic P123 triblock copolymer, (EO)<sub>20</sub>(PO)<sub>70</sub>(EO)<sub>20</sub> and (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES), 98%, were purchased from Sigma-Aldrich. Tetra-methoxy-silane (TMOS), 98%, was bought from Alfa Aesar. All chemicals were used as received without further purification. Lysine (K) and lauric acid (C12) were purchased from Sigma-Aldrich, K with 99% of purity were acquired from Bachem. Aminoacylases were produced from *S. ambofaciens*.

### **Aminoacylases of *S. ambofaciens* production**

The aminoacylases from *S. ambofaciens* were produced and partially purified following the procedure described by Bourkaib et al. (2020) and by using the same components [46].

### **Support preparation**

#### **SBA-15 preparation:**

The synthesis of SBA-15 silica was carried out following the standard procedure [48]. The synthesis was conducted by dissolving 2.66 g of Pluronic 123 (P123) in 100 mL of a chlorhydric acid solution (1 M) at room temperature. After complete dissolution of P123, 4.17 g of tetramethyl orthosilicate (TMOS) were added and the mixture was kept under stirring at room

temperature during 30 min. Afterwards, the solution was transferred in a Teflon-lined autoclave heated at 40°C during 24 h. Then the temperature was raised up to 100°C for 24 h. The mixture was then filtered and the material was submitted to extraction by ethanol during 48 h using a Soxhlet, in order to remove the surfactant. The obtained mesostructured silica material was finally dried at ambient atmosphere during one night to recover SBA-15 as a white powder.

#### **Meso-macroporous silica preparation:**

Hierarchical meso-macroporous silica material was prepared by “Dual Templating”, combining emulsions (for the macropores) and micellar solution (for the mesopores), following a procedure reported by Blin et al. [49]. The emulsions were prepared by dissolving 760 mg of R<sub>8</sub>F<sub>9</sub> [(EO)]<sub>9</sub> and 1760 mg of R<sub>7</sub>F<sub>7</sub> [(EO)]<sub>7</sub> fluorinated surfactants in 7.5 g of aqueous HCl at pH = 0 at 40°C. After complete dissolution of the fluorinated surfactants, 2 g of perfluorodecalin were added to the solution under vigorous stirring. The solution was kept under stirring for 1 night. Afterwards, 980 mg of TMOS were added to the solution which was kept under stirring at 40°C for 1 h. Then the mixture was transferred in a Teflon-lined autoclave in an oven at 100°C for 24 h. Afterwards, the surfactant was removed by ethanol extraction for 48 h (soxhlet) and the resulting white powder was dried at ambient atmosphere for 24 h.

#### **APTES functionalization of the materials:**

Both materials were functionalized with amino-propyl-tri-ethoxy-silane (APTES) at different molar percentages allowing to cover the silicas surface with amine function. During the functionalization a covalent bonding between silanols of the silica surface and the tri-alkoxy-silane moieties of APTES is formed [32]. In order to study the effect of APTES concentration on the performance of the immobilization and the enzymatic activity, six different functionalization loadings of organic functions (APTES) in the silica were performed : 0%, 1%, 5%, 10%, 25% and 50% (functionalization loading = (moles of organosilane/moles of organosilane + moles of silica) x 100). The functionalization was conducted by adding 1 g of the material in toluene (50 mL). The mixture was stirred and heated at 110°C, then the required amount of APTES (tab. 1) was added and the suspension was kept under stirring (400 rpm) over-night under reflux. After cooling, the mixture was filtered and washed two times with toluene, followed by two times with ethanol and dried over-night under vacuum to recover the functionalized materials as a powder. The resulting supports are labelled as SBA15n% for functionalized SBA-15 and MMSn% for functionalized meso-macroporous support, where n represent the silica/organic group molar ratio.

Tab. 1: quantity of APTES used for 1 g of material during the functionalization of both support (SBA-15 and MMS)

Functionalization (%)	0	1	5	10	25	50
APTES quantity (mL)	0	0.078	0.390	0.780	1.950	3.900

### **Immobilization of the aminoacylases of *S. ambofaciens* on the different materials**

The physical adsorption of the aminoacylases from *S. ambofaciens* was conducted by suspending 200 mg of the support (without or with functionalization) in 36 mL of TRIS buffer (TRIS 25 mM in water, NaCl 50 mM, pH=8) and 1 mL of the aminoacylases solution (20 mg/mL) was then added. The mixture was stirred during 18 h at 4°C. The final mixture was filtrated, washed two times with TRIS buffer and dried one night under air to afford functionalized or non-functionalized SBA-15-acylase or MMS-acylase.

Cross linking enzyme aggregates (CLEAs) of the immobilized enzyme on the functionalized SBA-15 with 50% APTES: the immobilized acylases on the SBA-15 functionalized with 50% APTES was conducted using different molar percentages of Glutaraldehyde from Sigma Aldrich with 25% purity. The addition of Glutaraldehyde results in a covalent bridge between the amino acids residues of the enzymes which can improve the catalytic performance and the stability of the enzyme [49]. In order to study the effect of glutaraldehyde concentration, different molar percentages were used: 0%, 1%, 5% and 10% (glutaraldehyde rate = (moles of glutaraldehyde x 100 / (moles of glutaraldehyde + moles of silica)). The functionalization was conducted by mixing 0.5 g of the functionalized SBA-15 in 5 mL of Tris HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8 containing the appropriate quantity of glutaraldehyde (34, 175 and 370 µL of glutaraldehyde solution for the 1, 5 and 10% molar ratio). The mixture was stirred at 4°C and 100 rpm by rotatory agitation overnight. The mixture was then filtrated and washed two times with the Tris HCl buffer and dried one night under vacuum to recover the final material as a brick red powder proofing the glutaraldehyde incorporation and CLEAs formation. As a reference sample, the free enzyme was also treated in the same way by using 370 µL of glutaraldehyde.

### **Characterization of the materials**

Nitrogen adsorption–desorption isotherms, Small angle X-ray scattering (SAXS) experiments and solid-state NMR spectra were all conducted following the same methodology and machinery described by [32]

Macropores were detected using mercury porosimetry on a Micromeritics Autopore IV 9500. The penetrometer (stem volume = 0.412 ml, penetrometer volume = 1 ml) was filled with 0.1 g of the sample. A low pressure (0.1 to 15 psia) followed by a high-pressure analysis (15 to 60 000 psia) were performed in order to detect pores down to 5 nm in diameter, the equilibration time is 10 seconds.

### **Enzyme activity assays**

#### **Hydrolysis reaction**

After the adsorption process, the activity of all immobilized enzyme was evaluated for their hydrolytic activity of the N $\alpha$ -acetyl-L-lysine as substrate. The enzymatic hydrolysis was carried out in test tubes containing 1.8 mL Tris-HCl (25 mM) NaCl (50 mM) at pH 8, 0.2 mL of the substrate (40 mM) and the quantity equivalent to 1 mg/mL of immobilized enzyme or the free enzyme (around 0.5 mg/mL) for a 2 mL final volume. The reaction was performed during 24 h at 37°C and 500 rpm stirring. Samples of 100  $\mu$ L were withdrawn and diluted 10 times in water for TLC and HPLC-MS analyses. The conversion rate was calculated from the measurement of lysine concentration released during the hydrolysis and corresponding to the percentage of lysine produced from acetyl-lysine hydrolysis by free or immobilized enzymes. For recycling stability, activity of immobilized aminoacylase was determined after 3 cycles and the corresponding relative hydrolytic activity of the immobilized enzymes was determined by taking the first reaction as reference (set as 100%). The specific activity of the enzymes was defined as the amount of lysine produced reported to the quantity (mg) of aminoacylases in the reaction medium.

#### **Acylation reaction**

The N- $\alpha$ -lauroyl-lysine synthesis activity of the aminoacylases was carried out in test tubes containing 0.1 M of lysine and 0.1 M of lauric acid in 2 mL of Tris-HCl (25 mM), NaCl (50 mM) at pH 8. A quantity equivalent to 1 mg/ml of the immobilized protein or 0.5 mg/mL of the free enzyme was then added to start the reaction. The reaction was conducted during 48 h at 45°C and 250 rpm stirring. 100  $\mu$ L samples were withdrawn and diluted 10 times with methanol/water (80/20, v/v) solution for the evaluation of the synthetic activity by TLC and HPLC.

#### **Analysis of the reaction medium**

##### **Qualitative analysis by TLC**

Before HPLC analysis, qualitative analysis of the production of lysine from the hydrolysis reaction and the acylated product from synthesis reaction were evaluated by TLC on Kieselgel G 60 Plates 20 cm×20 cm (Merck, Darmstadt, Germany). The mixture butanol (60 %)/acetic acid (20 %)/water (20 %) was used as mobile phase. Knowing that lysine contains two amino groups allowed the detection by spraying a commercial solution of ninhydrin reagent (Sigma-Aldrich).

### **Quantitative analysis by HPLC**

Quantitative analysis of the lysine produced during the hydrolysis reaction was performed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) coupled with a mass spectrometry (MS) Shimadzu®. The separation of the lysine from the other constituents was carried out using Hypercarb column (100 x 2,1 mm ; 5µm ; Phenomenex, USA). During the analysis the column temperature was set to 10°C. The mobile phases was composed of ultrapure water containing 20 mM Nonafluoropentanoic acid (NFPA) for phase A and pure acetonitrile for phase B. the phase B gradient used for the analysis was : 0 to 15 % during 10 min then 15 to 26% during 10 min then 26 to 50% during 10 min followed by an isocratic gradient at 50% during 10 min before the decrease of the concentration to 0% phase B for the equilibration of the column. The detection and the quantification of the lysine was done using mass analysis data lysine transition from  $M+H/z=147.10$  uma major ion daughter at  $M+H/z=84.10$ uma, coming from the dissociation generated after the collision with argon, in MRM positive mode (Multiple Reaction Monitoring). The apparatus is equipped with double ionisation or DUIS (Dual Interface Ionization System) with the ElectroSpray Ionization (ESI) and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI).

For synthesis production of lauroyl-lysine, the quantification of reaction conversion yield was conducted using HPLC (LC10 AD-VP, Shimadzu, France) equipped with a UV detector at 214 nm and a light-scattering low temperature evaporative detector (Shimadzu, France). A C18 amide 125×2.1 mm (Altima®, Altech, France) maintained at 25°C was used as the suitable separation column. The mobile phase (0.2 mL/min flow rate) consisted of solvent A: methanol/water/TFA (60/40/0.1 v/v/v) and solvent B: methanol/TFA (100/0.07). A linear elution gradient was applied to reach 95 % methanol/TFA after 6 min. This methanol concentration was maintained for 13 min and then decreased in 1 min to reach the initial methanol/water ratio until the end of the run (35 min). Calibrations were performed using standard curve fatty acids and purified commercial  $\alpha$ -lauroyl-lysine. The substrate conversion

yield was determined using the following equation: conversion yield (%) =  $(1 - ([\text{fatty acid}]_{\text{mol/L}} / \text{consumed} / [\text{fatty acid}]_{\text{mol/L}} \text{ initial})) \times 100$ .

## Results and discussion

### Immobilization of acylases onto the bare porous silica and activity of the supported biocatalysts

To investigate the influence of the porosity on the amount of immobilized enzyme and on its activity, the bare SBA-15 and MMS silicas was first used as support. For both supports, the nitrogen sorption isotherms display type IV isotherms, characteristic of the presence of mesopores in the materials according to the IUPAC classification (Fig 1A) [50]. The SBA-15 mesostructured silica adsorption/desorption isotherms exhibit a H1 hysteresis loop with two parallel and vertical branches, which are assigned to well defined cylindrical mesopores with homogeneous size. The physisorption isotherm of the MMS material is a combination of type IV and type II isotherms, featuring the presence of both meso- and macro-pores. The BJH pore size distribution represented in 1 B show a sharp peak in the case of SBA-15 while MMS shows a broader mesopore size distribution, evidencing a better homogeneity of the pore size for the SBA-15 material.

The values of the BET specific surface areas (SBET), the porous volumes (Vpor) and the pore diameter ( $\varnothing_{\text{pore}}$ ) are reported in table 2. Both materials exhibit nearly similar mesopores diameter (7.8 nm for MMS and 8.7 nm for SBA-15). However, the presence of macropores in the MMS silica results in higher porous volume (1.7 cm<sup>3</sup>/g) and specific surface area (802 m<sup>2</sup>/g) compared to SBA-15 (0.82 cm<sup>3</sup>/g and 650 m<sup>2</sup>/g, respectively). Such characteristics are expected to allow the immobilization of higher amount of enzyme on the MMS support. The mercury porosity analysis (Figure 2) features the presence of macropores whose the pore size distribution is centred on 4.7  $\mu\text{m}$ . In accordance with mercury porosity characterization, micrographs obtained by scanning electron microscopy (Figure 2) show the presence of sponge-like silica particles with macropores whose the size ranges from 1 to 3  $\mu\text{m}$ .

The SAXS patterns of SBA-15 shows three reflection peaks at  $q_1=11.0 \text{ nm}^{-1}$ ,  $q_2=6.3 \text{ nm}^{-1}$  and  $q_3=5.0 \text{ nm}^{-1}$  which verify the relation  $q_1:q_2:q_3 = 1: \sqrt{3}: 2$  and were assigned respectively to the 100, 110 and 200 diffraction planes of the 2D hexagonal arrangement of the mesoporous channels (Fig. 1. 1C). The first reflection peak ( $q_1$ ) was used to calculate Bragg distance which is in accordance with the literature (10.9 nm) [31,32]. The Bragg distance was used to determine the unit cell dimension ( $a_0 = 2d_{100}/\sqrt{3}$ ). The mesopore wall thickness was estimated to 4.0 nm-

1 by subtracting the pore size diameter determined by N<sub>2</sub> sorption isotherm to the unit cell  $a_0$  (tab 2). In the case of MMS (Fig. 1. 2C), only one broad peak is detected at around 9.0 nm<sup>-1</sup>, suggesting the formation of a wormhole-like mesopore network [49]. Assuming that the Bragg distance represents the sum of the mesopore diameter and of the mesopore wall thickness, the later can be estimated to 1.2 nm, which is 3 times lower than the one of the SBA-15.

The enzyme immobilization was carried out in the same conditions for both supports. The amount of the acylases immobilized on the support was around 3 % for the SBA-15 and more than 4% for the MMS which shows an improvement of the adsorption for the MMS material. The higher enzyme loading might result from both the presence of macropores which favour the enzyme diffusion in the porous network and to the higher porous volume ( $V_{por}$ ) and specific surface area (SBET) compared to the SBA-15 material. After immobilization the shape of the N<sub>2</sub> sorption isotherm was similar for both supports (Fig 1. 1A and 2A). A very important decrease of the SBET,  $V_{por}$  and the pore diameter ( $\varnothing_{pore}$ ), more pronounced when using MMS, was observed (fig 1 and tab 2). This result can be assigned to the pore filling with the enzyme and/or the partial alteration of the silica structure during the immobilization process performed in basic medium (pH=8). Indeed, silica is prone to hydrolysis under aqueous basic conditions. The adsorption of the enzyme at the outer surface of the materials cannot be excluded. SBA-15 is less prone to such textural modifications which is attributed to its higher wall thickness and higher level of silica condensation, what limits the structure collapse [19]. Such phenomenon is confirmed by SAXS patterns which evidence no significant changes before and after adsorption of the enzyme on the SBA-15 materials. On the contrary, the diffraction peak observed at 9.0 nm<sup>-1</sup> for the MMS material before immobilization nearly disappears after enzyme immobilization, suggesting a partial collapse of the silica structure. In both cases the immobilization rate was lower than in the literature [43,32]. Considering that the acylases present a PI of around pH 7 [36,38], such a result can be explained by electrostatic repulsions between the enzyme and the supports, which have an isoelectric point (PI) around pH 2-3.



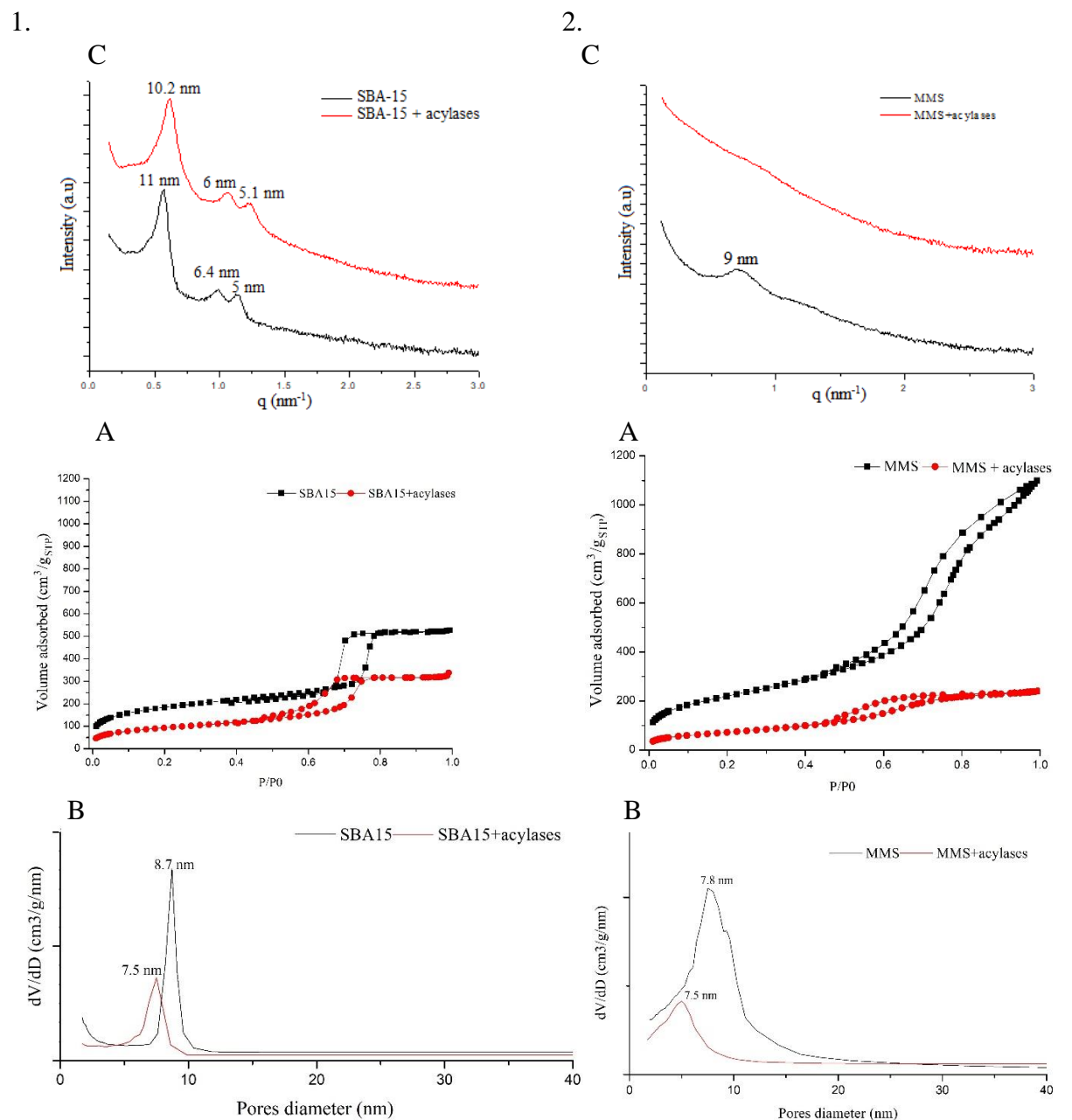
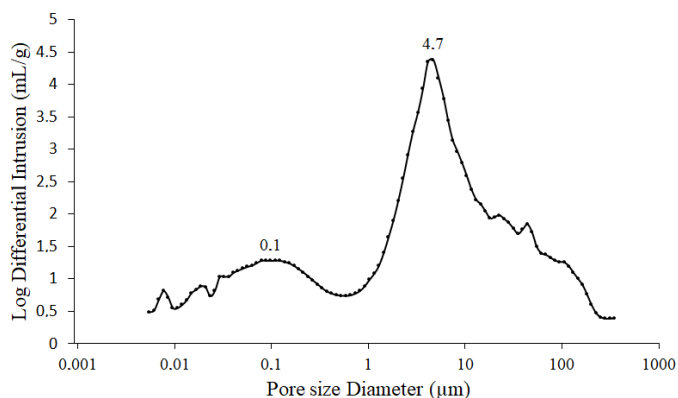


Fig 1. Nitrogen sorption isotherms (A), mesopores pore size distribution (B) and SAXS patterns (C) before and after immobilization of the non-functionalized SBA-15 (1) and MMS (2).

1.



2.

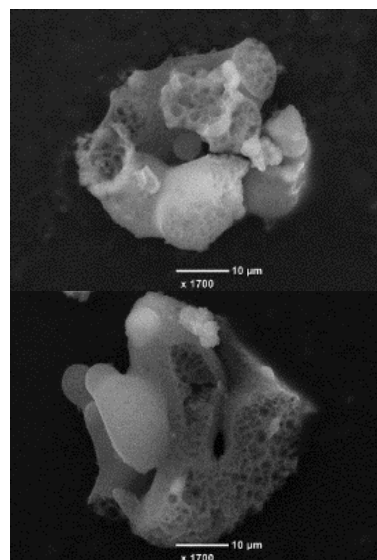


Fig 2. Pore size distribution obtained by mercury porosity analysis (1) and scanning electron microscopy images of MMS (2)

In order to evaluate their recycling potential, the behaviour of the immobilized enzymes was evaluated along successive experiments by using the hydrolytic reaction of the  $\alpha$ -acetyl-lysine as a reference reaction. The activity was evaluated by carrying out the reaction in 2 mL flask with magnetic stirring during 24 h. Then, the support was separated from the reaction medium by centrifugation and washed to times before being used for the next reaction (with a fresh substrate solution). The support was recycled two times (Figure 3). The first catalytic activity of the immobilized enzymes (around 1.67  $\mu$ M lysine / mg protein / h) was much lower than the one of the free enzymes which was around 167  $\mu$ M lysine / mg protein / h. As shown in figure 3, a significant decrease of the activity due to protein leaching along cycles was observed. Several authors described the same behaviour of immobilized enzymes on SBA-15 [32,52]. This can be explained by the weak interactions (Van der Waals or, at lower level, by hydrogen interactions) between the silica material and the protein. The higher desorption rate observed in the case of meso-macroporous support can be assigned either to the easy diffusion of the enzyme from inside the pore towards the reaction medium and/or to the collapse of the silica structure due to its low wall thickness.

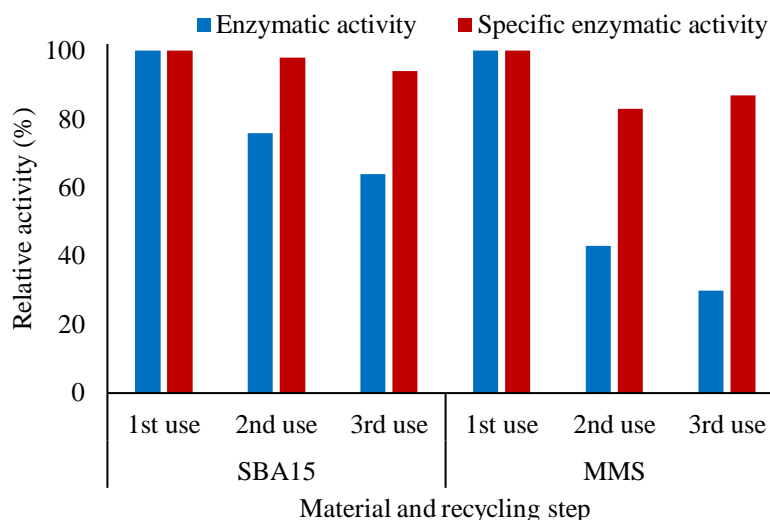


Fig 3. Relative activity of the immobilized acylases after support recycling compared to the initial activity set at 100%. in blue: relative conversion of the alpha acetyl-lysine, in red: relative conversion of the alpha acetyl-lysine reported by the amount of the protein present in the reaction medium

Tab 2. Physical characterisations of mesoporous (SBA-15) and meso-macroporous materials before and after immobilization of the aminoacylases from *S. ambofaciens*

Immobilization support	$S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	$V_{por}$ (cm <sup>3</sup> /g)	$\varnothing_{pore}$ (nm)	$d_{Bragg}$ (nm)	$a_0$ (nm)	Wall thickness (nm)	d110 (nm)	d200 (nm)
SBA-15	650	0.8	8.7	11.0	12.7	4.0	6.4	5.0
SBA-15-acylases	336	0.5	7.5	10.2	11.7	4.2	6.0	5.1
MMS	802	1.7	7.8	9.0	10.4	2.6	Np*	Np*
MMS-acylases	268	0.4	5.7	Np*	-	-	Np*	Np*

Np\*: no peak clearly detected

### Immobilization of acylases onto APTES-functionalized mesoporous (SBA-15) and meso-macroporous silica (MMS) supports

In order to investigate the possible improvement of the activity and stability of the immobilized enzymes by the silica surface modification, both materials were fonctionalized with 3-aminopropyl-tri-ethoxysilane (APTES).

As reminded in the introduction, several authors investigated the use of organosilane-functionalized silica materials for the immobilization of acylases [37,38,43]. They demonstrated that APTES-functionalized materials seem to be the most suitable to improve the activity and the stability of penicillin acylase and the acylase I from *Aspergillus melleus*. For this reason, the APTES was used in this study with different loading, in order to evaluate the

influence of the surface modification. The grafting of APTES changes the surface properties of the silica by increasing surface hydrophobicity due to the presence of propyl groups and by reducing the quantity of free hydroxyl groups [43]. Moreover, the nature of the interactions between the enzyme and the functionalized support strongly depend on their respective pI and of the pH. Electrostatic interactions between the positively charged amino group of APTES ( $R-NH_3^+$ ) and the negatively charged carboxyl group of the glutamic and aspartic acid residue of the surface of the immobilized proteins possibly occur but due to the lack of information about the 3D structure of the enzyme, there is no way to confirm this hypothesis. It is also possible to observe an improvement of the hydrogen interactions between non-protonated APTES amino group ( $R-NH_2$ ) and the enzyme as described in the literature [37]. The functionalized materials (SBA-15 and MMS) were physically characterized before and after immobilization of the aminoacylases of *S. ambofaciens* and the activities of the immobilized enzymes were compared. Silicon NMR ( $^{29}Si$  NMR) was used to characterize the functionalization rate of the supports. The  $^{29}Si$  NMR spectra of the functionalized SBA-15 and MMS (with 1% and 50% APTES) are given in fig.4A. Before functionalization, the  $^{29}Si$  RMN spectrum features the presence of Q2 ( $Si(OSiOH)_2$ ), Q3 ( $Si(OSi)_3OH$ ) and Q4 ( $Si(OSi)_4$ ) species assigned to the peaks at -95 ppm, -105 ppm and -115 ppm. After grafting with 1% APTES, Q3 and Q4 species are still observed and a weak peak appears at -71 ppm, assigned to T3 ( $(SiO)_3SiC$ ) species, evidencing the covalent linking of the propylamine moieties to the silica support. At higher loading (50% APTES) the T3 peak becomes more intense and a second peak at -64 ppm appears, assigned to T2 ( $(SiO)_2Si(OH)C$ ) species, both peaks featuring the higher grafting rate of APTES on silica material as compared to the 1% APTES material.

By integration of the Tn and Qn signals, using the formula  $\int Tn / (\int Tn + \int Qn)$ , the functionalization rate of the silica support by APTES was estimated. Results are reported in Table 3. Noteworthy, the  $^{29}Si$  RMN spectra of the APTES-functionalized materials are similar before and after enzyme immobilization, suggesting that the immobilization procedure does not impact (or in a minor extent) the covalent bonds between APTES and silica.

Tab 3: APTES functionalization rate calculated from  $^{29}Si$  NMR characterizations

Material	SBA-15_1% APTES	SBA-15_50% APTES	MMS_1% APTES	MMS_50% APTES
Functionalization rate (%)	12	49	6	46

Carbon NMR ( $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR) spectra of the supports functionalized with 1% and 50% APTES before acylase immobilization are presented in fig. 4 B and C. Three major peaks are observed for SBA-15 at around 43, 23 and 10 ppm and at around 39, 26 and 6.5 ppm for MMS with APTES (50%). These peaks correspond to the carbon atoms of the  $\text{CH}_3\text{-N}$ ,  $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3\text{-Si}$  groups of APTES, respectively [32,37,53].

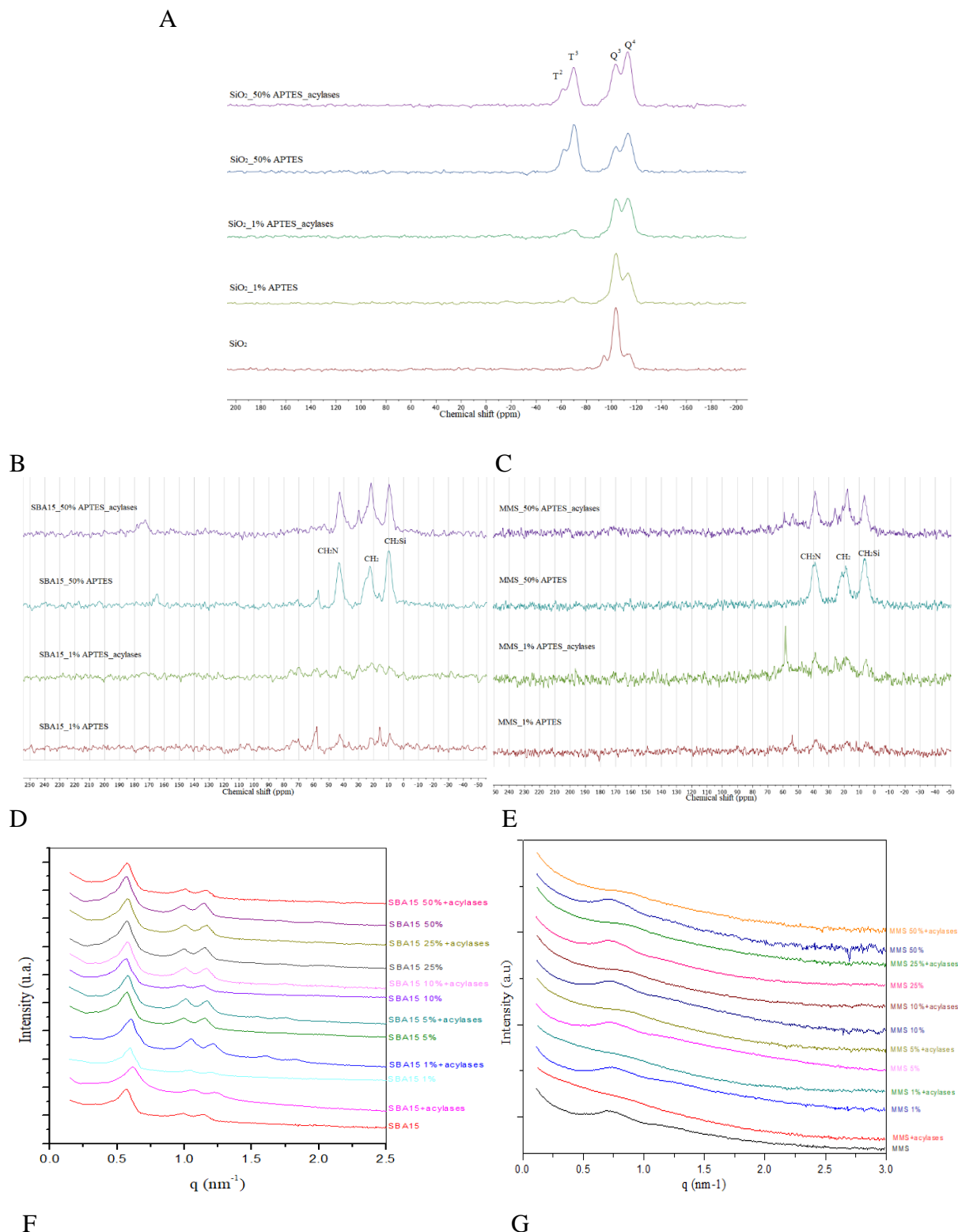
After enzymes immobilization, a new peak appears at around 174 ppm, for the SBA-15 functionalized with 50% APTES. This signal might be the result of the peptide linkage ( $\text{NH-CO}$ ). Another peak is present at around 60 ppm, especially when the enzymes were immobilized on SBA-15, it might correspond to the carbon atoms close to a nitrogen atom of the  $\alpha$ -amino group of the amino acids chain ( $\text{NH-CH(R)-CO}$ ) [31]. Those peaks confirm the presence of the enzyme at the surface of the materials however the low protein immobilized amount make the detection by NMR difficult.

SAXS patterns reported on fig. 4 D and E show that the mesostructure of the materials is preserved after the grafting step. Indeed, the reflexion spectra of the functionalized and non-functionalized SBA-15-based materials are similar, with the presence of three reflection peaks characteristics of the hexagonal configuration of the mesopores, as discussed above. Similarly, MMS-based materials exhibit similar SAXS patterns before and after the functionalization. After immobilization of acylases on the different supports, the same trend was observed as the one described above, i.e.: no significant change in the ordered hexagonal mesopores of the SBA-15 is noticed while a partial collapse of the mesoporous structure (decrease of the peak intensity) of the MMS is observed.

After the functionalization, the general shape of the adsorption isotherms is not modified (fig 4. F and G). However, it is evident that higher the APTES content, lower the specific porous volume of the materials which is assigned to pore filling by the grafted organic moieties. Regarding the SBA-15-based materials, a significant decrease of the BET specific surface area, porous volume and pore diameter after enzymes immobilisation is observed on the non-functionalized SBA-15 support (figure 5). Such a result can be attributed to pore filling by the enzymes. However, it is noteworthy that no significant change of the porous volume and pore diameter is observed after enzymes immobilization on the APTES-functionalized SBA-15-based materials. This might be due to the presence of grafted aminopropyl groups that prevent the diffusion of the enzymes toward the inside of the mesoporous network. The slight decrease of the BET specific surface area after enzymes immobilization on the APTES-functionalized

## Chapitre V : Performances des acylases de *S. ambofaciens* immobilisées

SBA-15-based materials can be assigned to the enzyme adsorption on the external surface area of the support. Contrarily to SBA-15-based materials, a strong decrease of the pore diameter is observed for the MMS-based materials after enzymes immobilization. Such a result can be assigned to the macropores filling by the enzyme and/or the partial collapse of the silica structure along the immobilization step, as discussed previously.



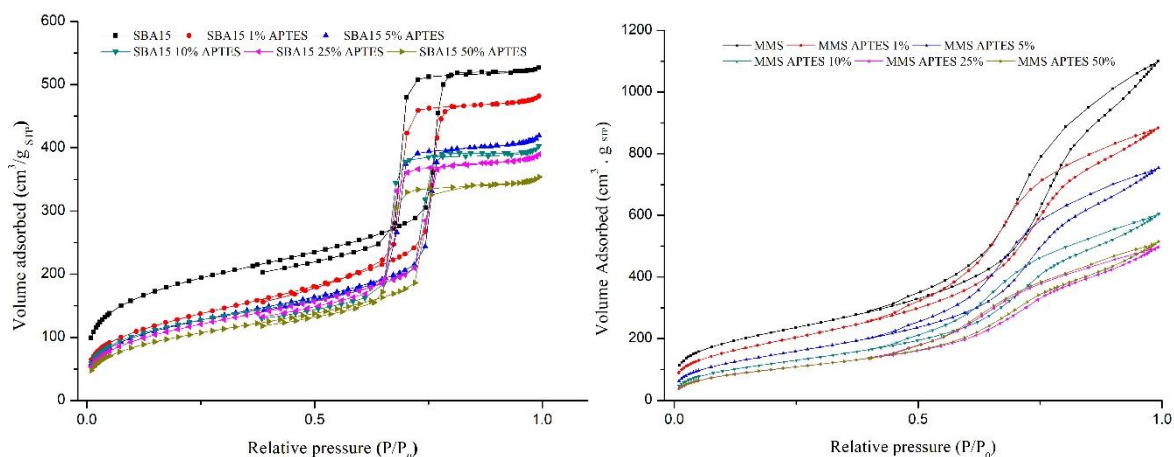


Fig 4:  $^{29}\text{Si}$  CPMAS NMR spectra (A),  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spectra (B for SBA-15 and C for MMS) and SAXS patterns (D for SBA-15 and E for MMS) of the functionalized and non-functionalized supports with and without enzyme and nitrogen sorption isotherms the functionalized and non-functionalized supports (F for SBA-15 and G for MMS).

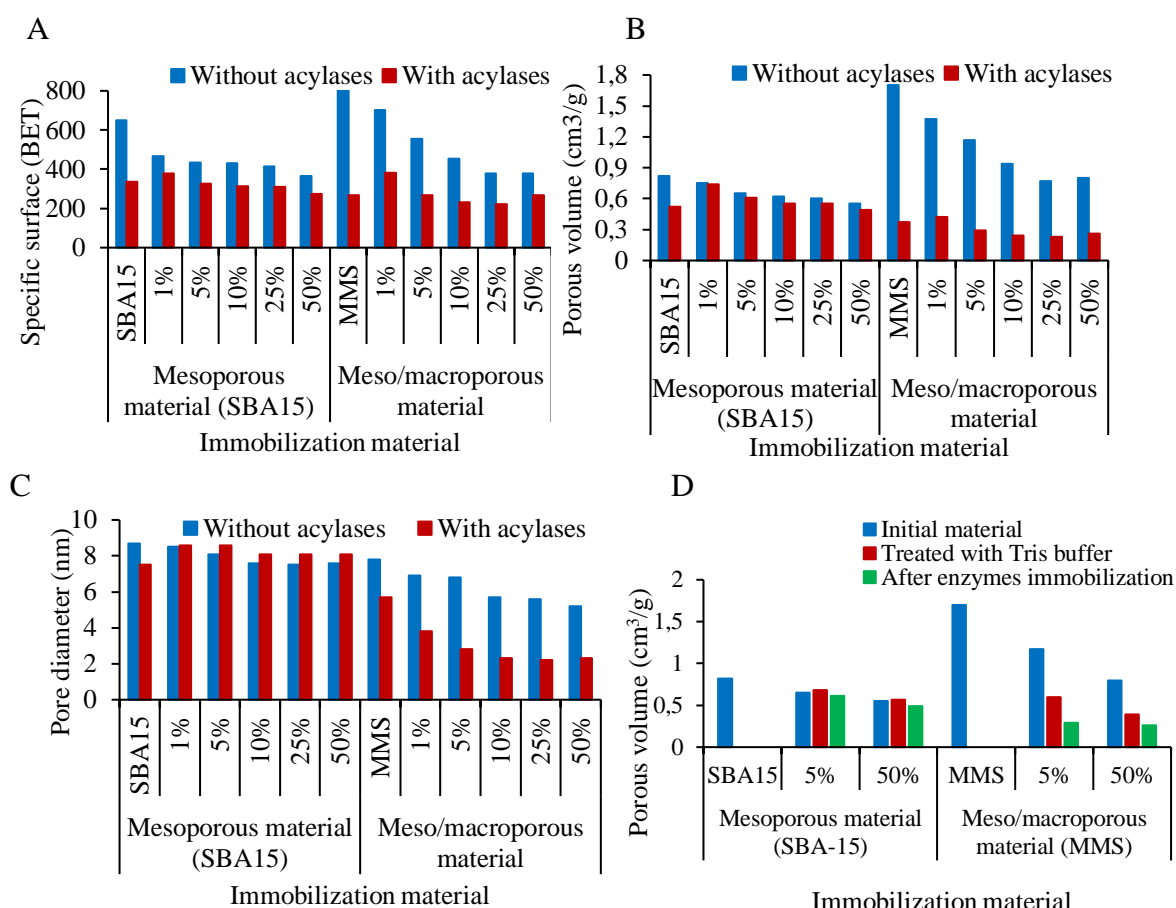


Fig 5. Specific surface area (A), porous volume (B) and pore diameter (C) evolution after functionalization and immobilization steps on MMS and SBA-15 supports and evolution of the porous volume of the 5% and 50% APTES functionalized MMS and SBA-15 supports after treatment with the buffer used for the immobilization with and without enzyme (D).

After the adsorption of the aminoacylases from *S. ambofaciens* on the different kind of functionalized materials, the quantity of immobilized proteins was determined by BCA analysis of the filtrate, and the washing solution. As shown in figure 6, the quantity of the adsorbed proteins depends on the nature of the support and on the functionalization rate. The enzyme loading on MMS is more or less 1.5 time higher than on SBA-15. This result can be related to the presence of the second pore network; i.e. the macropore one in the MMS material which improves the accessibility of the enzyme into the porous network. The results show that the functionalization rate considerably improves the immobilized acylases amount (more than 2 times) for both porous materials when increasing the APTES loading from 0 to 10%. For APTES loading higher than 10% and up to 50% the enzyme loading reaches a plateau at around 0.65 mg prot/mg material for SBA-15-APTES support and around 0.95 mg prot./mg material for MMS-APTES material. The increase of enzyme loading for APTES grafting from 0% to 10% can be explained by the modification of surface properties of the materials by grafting APTES molecules which reduce the presence of hydroxyl group and increase the possible hydrophobic, electrostatic and hydrogen interactions between the grafted organosilane and the enzyme. The reduction of the presence of the free -OH at the surface might prevent the electrostatic repulsion caused by the negative charge of the material and the enzyme surface at the pH used during the immobilization process ( $\text{pH } 8 > \text{pI}$  of the material and the enzymes). Moreover, the hydrophobic interactions between the propyl part of the APTES and the amino acids residues of the enzyme surface might be promoted. The same trend was described by Chong et al. [38]. The authors reported a faster and better enzyme immobilization of penicillin acylase on SBA-15 functionalized with APTES, compared to the native SBA-15 [38]. For both supports, the stabilization of the immobilization rate after 10% APTES functionalization can be attributed to a saturation of the surface of the materials by the APTES and a possible obstruction of the mesopores by organic moieties.



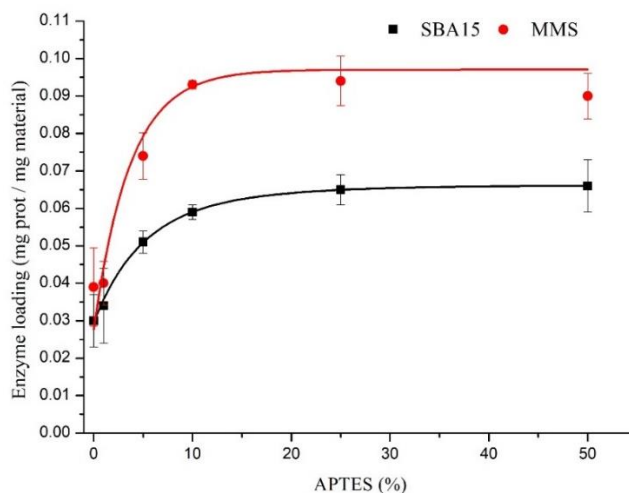


Fig 6. Amount of enzymes adsorbed on functionalized SBA-15 and MMS materials after 18 h immobilization at 4°C under 100 rpm rotatory agitation.

The results concerning the acylases immobilization show a very important difference between SBA-15 and MMS supports. In the case of the functionalized SBA-15, whatever the functionalization rate, only very slight changes of the specific surface area and of the pore volume are observed. This can be related to diffusional limitations of the enzyme into the mesopores. Indeed, as shown in figure 5. C, no change in the pore diameter was observed after immobilization on the functionalized unlike the non-functionalized SBA-15. The quantification of the protein immobilized on the support (fig 6) shows an improvement of the adsorbed amount of enzymes by increasing the APTES rate and the  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spectra confirm clearly the presence of the enzymes at the surface of the functionalized materials. Those observations suggest that a major part of the enzyme is immobilized on the external surface area of the functionalized SBA-15 assigned to diffusional limitations of the enzymes into pores of the SBA-15, due to the presence of APTES.

The MMS-based materials show a completely different behaviour after the immobilization on the functionalized material. An important decrease of the specific surface area and of the porous volume is observed after immobilization on the different functionalized MMS. The final values reached are similar to the ones of SBA-15 materials after immobilization. These results strongly suggest that the immobilization of the acylases occurred inside the pores of the MMS, promoted by the presence of larger pore diameter and the possible funnel organization between macropores and mesopores allowing a better diffusion of enzyme molecules inside the mesoporous structure. Indeed, according to the figure 5. C an important decrease of the pore size and an increase of the wall thickness of the mesopores was registered, confirming the

immobilization of the acylases inside the pores. However, the possible immobilization of the enzymes at the external surface cannot be excluded. In order to check if there were a collapse of the MMS mesoporous structure causing a decrease of the material properties, the SBA-15 and MMS functionalized with 5% and 50% functionalized was treated with the buffer (buffer Tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8) in the same way as when the immobilization was conducted. The adsorption/desorption isotherm showed a significant decrease (50%) of the porous volume of the MMS compared to the SBA-15 where no change was registered after the treatment with only the buffer (figure 5.D). In addition, the pore size of the material after the treatment without enzyme showed also a significant decrease passing from 6.8 to 4.6 for MMS functionalized with 5% APTES and from 5.2 to 4.9 for the one functionalized with 50% APTES while no change of the mesoporosity of the SBA-15 were observed. This result confirms the collapse of the mesostructured of the MMS material due to a fragile structure and a pore wall thicknesses lower than the one of the SBA-15 allowing more resistance (pore wall thicknesses of 2.5 nm for MMS and around 4 nm for SBA-15). The reduction of the pore size may cause a diffusional limitation of the enzymes into the mesopores which mean that the they are essentially immobilized in the macro-porosity of the MMS. On the other hand, if the enzymes enter the mesopores which is likely the case because of the higher decrease of the pore size when the enzyme solution is used, they can be entrapped in there which can stabilise the enzyme inside the pore but can induce a diffusional limitation of the substrate to the enzyme during the reaction. This can be confirmed by the activity evaluation.

Activity of the physically immobilized aminoacylases on APTES-functionalized materials (SBA-15 and MMS)

In order to evaluate the catalytic performances of the immobilized enzymes on the different functionalized materials, the N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine hydrolysis reaction was performed in Tris HCl buffer at pH 8 and with the same enzyme equivalent amount (1 mg proteins/mL). The conversion rates of the immobilized enzymes are presented on figure 7.A. The results show that the immobilized enzymes exhibit a catalytic activity, what can be explained by the orientation of the enzyme at the surface of the support by exposing the active site to the reaction medium resulting in an increase of the enzyme/substrate interactions and a better diffusion of the reactants towards the active sites. However, as expected, in all cases the hydrolytic activity was much lower than the free enzymes which show a complete hydrolysis of the substrate after 24 h in the same operational conditions. Several authors described an improvement of the catalytic activity after immobilization of acylases on APTES functionalized materials. Chong et al. [38]

immobilized the penicillin acylase on functionalized and non-functionalized SBA-15. They showed that the APTES was the most appropriate organosilane compared to other organosilanes (4-(trimethoxysilyl)-butyronitrile vinyltriethoxysilane, (3-Mercaptopropyl) tri-methoxysilane, ...) for the immobilization of this enzyme with around two times improvement of the activity compared to the one immobilized on non-functionalized SBA-15 [38]. Jesionowski et al. [37] performed the immobilization of the acylase I from *Aspergillus melleus* on amino and carbonyl functionalized Stöber silica. They also demonstrated an important increase in the catalytic activity by using APTES functionalized materials. This was related to a better orientation of the enzyme avoiding the obstruction of the active site of the enzyme. Radhakrishna et al. (2013) explained the phenomena implicated in the improvement of the catalytic activity of the enzymes immobilized on moderately hydrophobic surface by a better stiffening of the enzyme at the surface of the material without any conformational disruption [41].

Regarding our results (figure 7.A), the catalytic activity of the SBA-15-APTES-Enzyme materials seems to be correlated to their enzyme loading, which itself depends on the APTES functionalization rate of the support, as discussed above. An increase of the enzyme loading and material activity is observed for APTES grafting rate increasing from 1% to 10%, then a plateau is reached between 10% and 50%. The MMS-based materials exhibit a significantly lower activity than the SBA-15-based ones, although the enzyme loading is around 1,5 times higher on the MMS support as compared to the SBA-15 one. Such results feature that the enzyme activity (turnover frequency) is much higher on the SBA-15 supports than on the MMS ones. Moreover, the activity of the immobilized enzymes on the functionalized MMS is weakly affected by the APTES rate unlike the functionalized SBA-15. These results can be related to the partial collapse of the MMS porous network observed in the previous section, restricting the accessibility of the substrate to the enzyme. On the contrary, in the case of APTES functionalized SBA-15 the support characterisations strongly suggest that the main part of the enzymes is adsorbed at the external surface of the material which makes them more exposed to the substrate, thus reducing the diffusional limitations of the substrate to the active site. The thicker walls of SBA-15 make it more resistant to collapsing phenomena compared to MMS. Based on these results, the functionalized SBA-15 was selected for the rest of the study.

The ability to reuse the immobilized biocatalyst is an important factor to determine the economic viability of a process. The immobilization of the acylases on non-functionalized SBA-15 previously described, showed an important leaching of the enzymes after the first use. The functionalization of the SBA-15 with APTES is supposed to improve the stabilization of

the enzymes on the material by introducing hydrophobic interactions and avoiding electrostatic repulsions. The results of the measurement of the protein desorption after several uses of the supported material is presented on figure 7.B. The immobilized enzymes on the functionalized material present a better stability after the first reuse compared to the non-functionalized one. However, after the second reuse, an important leaching of the protein was observed to reach the same amount of enzymes as the one with non-functionalized material. The desorption of the enzymes can be explained by the moderately hydrophobic surface which exhibit better affinity for this enzyme than the highly hydrophilic one of pure SBA-15 but not enough to retain the enzymes and to resist to the mechanical shear of the magnetic agitation mode used during the reaction.

These immobilized enzymes were also evaluated for their synthetic activity by using lauroyl-lysine synthetic reaction, using L-lysine and lauric acid as substrates with an equimolar ratio. The relative activity compared to the activity of the free enzymes is presented on the figure 7.C. The evolution of the synthetic activity depending on the APTES functionalization rate follows the same trend as the one obtained for the hydrolytic activity: an increase of the APTES rate results in an increase in the conversion rate. In order to check if there was no change in the regioselectivity of the immobilized acylases, LC-MS-MS analysis of the reaction products was conducted. In all cases, the results show the apparition of only a mono-acylated product corresponding to the acylated lysine on the alpha amino group. The same MS2 profile was obtained by using the free enzymes [46]. However, in all cases, a significant loss of the synthesis activity (more than 90 %) was observed compared to the free acylases. This loss can be explained by diffusional limitations of the substrate emulsion to the active site which was more difficult than the use of a single molecule as substrate. The evaluation of the protein leaching after the three days synthesis reaction shows that around 23 % was desorbed from the silica materials.

In order to reinforce the stability of the enzymes at the surface of the immobilization support, an additional chemical treatment of the immobilized enzymes on the SBA-1550% with glutaraldehyde was conducted. This treatment allows the formation of cross-linking enzyme aggregates (CLEAs) between the immobilized enzymes on the material. Different glutaraldehyde ratios were used in order to determine its influence on the activity. After the treatment, no loss of the already immobilized enzymes was detected by BCA analysis of the filtration and washing solutions. According to the results reported on the figure 7.D the formation of cross-linking between the enzymes led to a dramatic loss of the activity compared

to the non-treated material. The increase of the glutaraldehyde percentage was accompanied with a decrease of the enzymatic activity. The SAXS analysis didn't show any structural modifications of the mesopores. The production of CLEAs using the free enzymes and 10% glutaraldehyde showed a complete loss of the catalytic activity. This result can be explained by the formation of covalent bridges between the protein amino acids residues causing a distortion of the protein conformation and the active site. Due to the fragile structure of those aminoacylases, the CLEAs formation was not suitable for the improvement of both the activity and the stability of these enzymes.

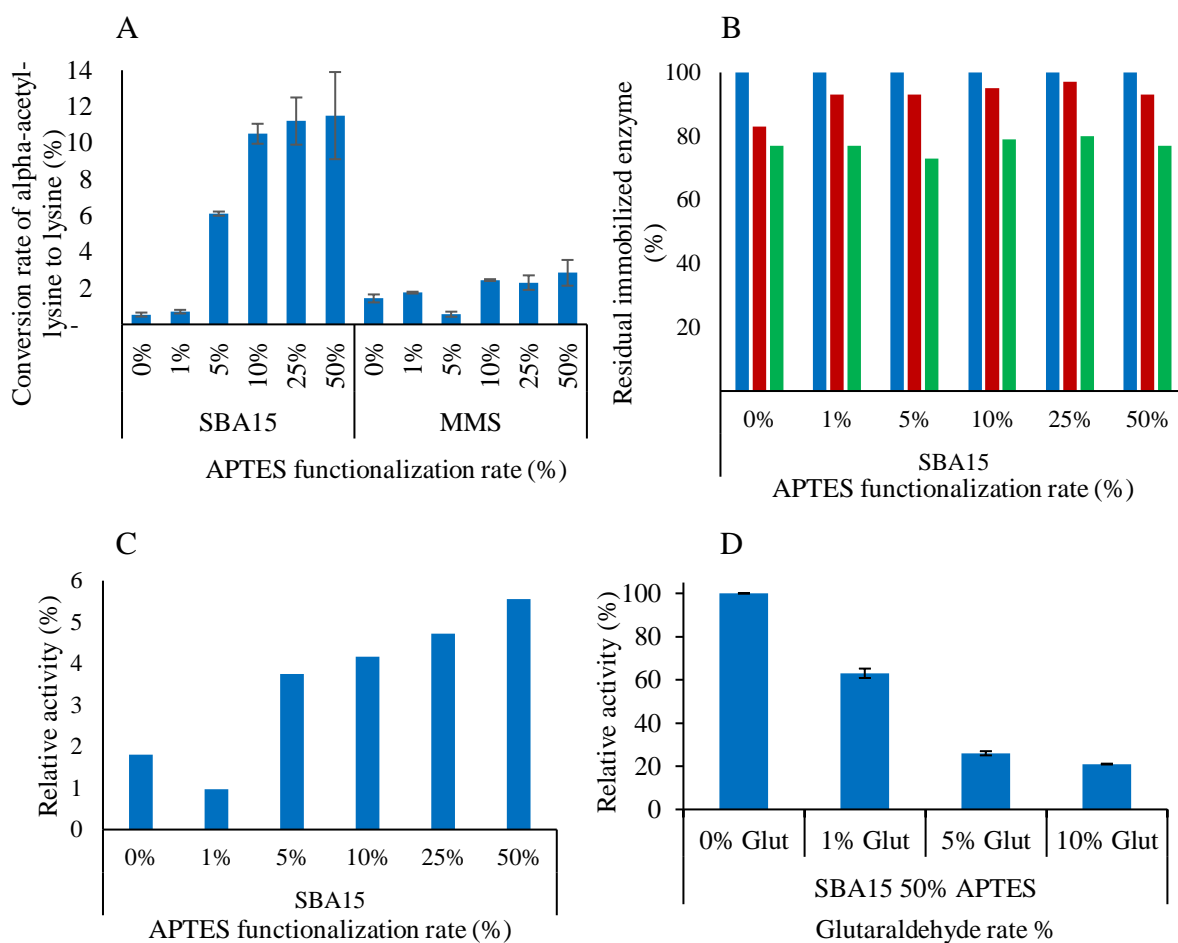


Fig 7. A. Determination of the N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine hydrolytic activity of both APTES functionalized materials (24 h at 37 °C, 500 rpm), B. relative residual adsorbed proteins on the APTES functionalized SBA15 after re-use for 3 cycles, C. relative synthetic activity compared to the free enzymes (72 h at 45°C, 600 rpm), D. relative hydrolytic activity of the cross linked enzyme aggregate post immobilization on the SBA15 functionalized with 50% APTES (24 h at 37 °C, 500 rpm)

### Conclusion:

The aim of this study was to investigate the influence of the pores size and of the surface functionalization of (macro)-mesoporous silica-based materials on the immobilization and the activity of the aminoacylases from *S. ambofaciens*. The use of meso-macroporous materials (MMS) allowed higher physisorption of the enzymes due to the presence of macropores but the activity was better after immobilization on mesoporous silica material (SBA-15). The functionalization of the materials with APTES allowed an increase of the catalytic performances of the enzymes related to a better orientation of the active site influenced by the increase of the surface hydrophobicity. However, the stability was low even after the surface functionalization. In order to improve the stability and the activity of the acylases the evaluation of other organosilanes with different chain lengths can be considered. Furthermore, it was demonstrated that the aminoacylases from *S. ambofaciens* are cobalt dependent: work is in progress to favour the co-condensation of cobalt in the material preparation that might also improve the catalytic performances.

### References:

- [1] C. Rondel, I. Alric, Z. Mouloungui, J.-F. Blanco, F. Silvestre, Synthesis and Properties of Lipoamino Acid–Fatty Acid Mixtures: Influence of the Amphiphilic Structure, *Journal of Surfactants and Detergents*. 12 (2009) 269–275. <https://doi.org/10.1007/s11743-009-1121-y>.
- [2] R.A. Sheldon, J.M. Woodley, Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.
- [3] R.A. Sheldon, D. Brady, Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis, *ChemSusChem*. 12 (2019) 2859–2881. <https://doi.org/10.1002/cssc.201900351>.
- [4] A. Madhavan, R. Sindhu, P. Binod, R.K. Sukumaran, A. Pandey, Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications, *Bioresource Technology*. 245 (2017) 1304–1313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.031>.
- [5] M. Koreishi, D. Zhang, H. Imanaka, K. Imamura, S. Adachi, R. Matsuno, K. Nakanishi, A Novel Acylase from *Streptomyces mobaraensis* that Efficiently Catalyzes Hydrolysis/Synthesis of Capsaicins as Well as N-Acyl-L-amino Acids and N-Acyl-peptides, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 72–78. <https://doi.org/10.1021/jf052102k>.
- [6] M. Koreishi, R. Kawasaki, H. Imanaka, K. Imamura, K. Nakanishi, A novel  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of N $\epsilon$ -acyl-L-lysines, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 82 (2005b) 631–637. <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1121-2>.
- [7] L. Dettori, F. Ferrari, X. Framboisier, C. Paris, Y. Guiavarc'h, L. Hôtel, A. Aymes, P. Leblond, C. Humeau, R. Kapel, I. Chevalot, B. Aigle, S. Delaunay, An aminoacylase activity from *Streptomyces ambofaciens* catalyzes the acylation of lysine on  $\alpha$ -position and peptides on N-terminal position, *Engineering in Life Sciences*. 18 (2017) 589–599. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700173>.

- [8] Y. Takakura, Y. Asano, Purification, characterization, and gene cloning of a novel aminoacylase from Burkholderia sp. strain LP5\_18B that efficiently catalyzes the synthesis of N-lauroyl-L-amino acids, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 83 (2019) 1964–1973. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1630255>.
- [9] M. Bilal, J. Cui, H.M.N. Iqbal, Tailoring enzyme microenvironment: State-of-the-art strategy to fulfill the quest for efficient bio-catalysis, *International Journal of Biological Macromolecules*. 130 (2019) 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.141>.
- [10] R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>.
- [11] K.C. Badgular, B.M. Bhanage, Immobilization of lipase on biocompatible co-polymer of polyvinyl alcohol and chitosan for synthesis of laurate compounds in supercritical carbon dioxide using response surface methodology, *Process Biochemistry*. 50 (2015) 1224–1236. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.019>.
- [12] A.S. Bommarius, M.F. Paye, Stabilizing biocatalysts, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6534–6565. <https://doi.org/10.1039/C3CS60137D>.
- [13] M. Hartmann, X. Kostrov, Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges, *Chemical Society Reviews*. 42 (2013) 6277–6289. <https://doi.org/10.1039/C3CS60021A>.
- [14] J. Zdarta, A.S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility, *Catalysts*. 8 (2018) 92. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>.
- [15] J.M. Nelson, E.G. Griffin, ADSORPTION OF INVERTASE., *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 1109–1115. <https://doi.org/10.1021/ja02262a018>.
- [16] A.A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, Enzyme immobilization: an update, *J Chem Biol*. 6 (2013) 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.
- [17] B. Thangaraj, P.R. Solomon, Immobilization of Lipases – A Review. Part II: Carrier Materials, *ChemBioEng Reviews*. 6 (2019) 167–194. <https://doi.org/10.1002/cben.201900017>.
- [18] M. Bilal, H.M.N. Iqbal, Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization, *Coordination Chemistry Reviews*. 388 (2019) 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.024>.
- [19] J. Jacoby, A. Pasc, C. Carteret, F. Dupire, M.J. Stébé, V. Coupard, J.L. Blin, Ordered mesoporous materials containing *Mucor Miehei* Lipase as biocatalyst for transesterification reaction, *Process Biochemistry*. 48 (2013) 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.003>.
- [20] H.-X. Zhou, K.A. Dill, Stabilization of Proteins in Confined Spaces, *Biochemistry*. 40 (2001) 11289–11293. <https://doi.org/10.1021/bi0155504>.
- [21] Y. Wang, F. Caruso, Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation, *Chem. Mater.* 17 (2005) 953–961. <https://doi.org/10.1021/cm0483137>.
- [22] L. Bayne, R.V. Ulijn, P.J. Halling, Effect of pore size on the performance of immobilised enzymes, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 9000–9010. <https://doi.org/10.1039/C3CS60270B>.
- [23] E. Santamaría, A. Maestro, M. Porras, J.M. Gutiérrez, C. González, Preparation of structured meso–macroporous silica materials: influence of composition variables on material

characteristics, *J Porous Mater.* 21 (2014) 263–274. <https://doi.org/10.1007/s10934-013-9771-6>.

[24] S. Kim, J. Jacoby, M.-J. Stebe, N. Canilho, A. Pasc, Solid Lipid Nanoparticle - Functional Template of Meso-Macrostructured Silica Materials, American Chemical Society, 2015. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01959404> (accessed February 18, 2020).

[25] J. Esquena, J. Nestor, A. Vílchez, K. Aramaki, C. Solans, Preparation of Mesoporous/Macroporous Materials in Highly Concentrated Emulsions Based on Cubic Phases by a Single-Step Method, *Langmuir.* 28 (2012) 12334–12340. <https://doi.org/10.1021/la302120f>.

[26] J. Nestor, A. Vílchez, C. Solans, J. Esquena, Facile Synthesis of Meso/Macroporous Dual Materials with Ordered Mesopores Using Highly Concentrated Emulsions Based on a Cubic Liquid Crystal, *Langmuir.* 29 (2013) 432–440. <https://doi.org/10.1021/la303801b>.

[27] J.-L. Blin, J. Jacoby, S. Kim, M.-J. Stébé, N. Canilho, A. Pasc, A meso-macro compartmentalized bioreactor obtained through silicalization of “green” double emulsions: W/O/W and W/SLNs/W, *Chem. Commun.* 50 (2014) 11871–11874. <https://doi.org/10.1039/C4CC06007E>.

[28] M. Hoarau, S. Badieyan, E.N.G. Marsh, Immobilized enzymes: understanding enzyme – surface interactions at the molecular level, *Org. Biomol. Chem.* 15 (2017) 9539–9551. <https://doi.org/10.1039/C7OB01880K>.

[29] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Adsorption.* 20 (2014) 801–821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>.

[30] D.-M. Liu, J. Chen, Y.-P. Shi, Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 102 (2018) 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.

[31] N. Canilho, J. Jacoby, A. Pasc, C. Carteret, F. Dupire, M.J. Stébé, J.L. Blin, Isocyanate-mediated covalent immobilization of *Mucor miehei* lipase onto SBA-15 for transesterification reaction, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 112 (2013) 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.024>.

[32] L. Dettori, F. Vibert, Y. Guiavarc’h, S. Delaunay, C. Humeau, J.L. Blin, I. Chevalot, N- $\alpha$ -acylation of lysine catalyzed by immobilized aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* in aqueous medium, *Microporous and Mesoporous Materials.* 267 (2018) 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.03.018>.

[33] J.J. Gooding, S. Ciampi, The molecular level modification of surfaces: from self-assembled monolayers to complex molecular assemblies, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 2704–2718. <https://doi.org/10.1039/C0CS00139B>.

[34] D. Zhao, C. Peng, J. Zhou, Lipase adsorption on different nanomaterials: a multi-scale simulation study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2014) 840–850. <https://doi.org/10.1039/C4CP04696J>.

[35] L.-C. Sang, M.-O. Coppens, Effects of surface curvature and surface chemistry on the structure and activity of proteins adsorbed in nanopores, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 6689–6698. <https://doi.org/10.1039/C0CP02273J>.

[36] J. Grimaldi, M. Radhakrishna, S.K. Kumar, G. Belfort, Stability of Proteins on Hydrophilic Surfaces, *Langmuir.* 31 (2015) 1005–1010. <https://doi.org/10.1021/la503865b>.



- [37] A. Kołodziejczak-Radzimska, J. Zdarta, T. Jesionowski, Physicochemical and catalytic properties of acylase I from *Aspergillus niger* immobilized on amino- and carbonyl-grafted stöber silica, *Biotechnology Progress*. 34 (2018) 767–777. <https://doi.org/10.1002/btpr.2610>.
- [38] A.S. Maria Chong, X.S. Zhao, Functionalized nanoporous silicas for the immobilization of penicillin acylase, *Applied Surface Science*. 237 (2004) 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.06.080>.
- [39] G. Raffaini, F. Ganazzoli, Protein Adsorption on a Hydrophobic Surface: A Molecular Dynamics Study of Lysozyme on Graphite, *Langmuir*. 26 (2010) 5679–5689. <https://doi.org/10.1021/la903769c>.
- [40] F. Felsovalyi, P. Mangiagalli, C. Bureau, S.K. Kumar, S. Banta, Reversibility of the Adsorption of Lysozyme on Silica, *Langmuir*. 27 (2011) 11873–11882. <https://doi.org/10.1021/la202585r>.
- [41] M. Radhakrishna, J. Grimaldi, G. Belfort, S.K. Kumar, Stability of Proteins Inside a Hydrophobic Cavity, *Langmuir*. 29 (2013) 8922–8928. <https://doi.org/10.1021/la4014784>.
- [42] J. Grimaldi, M. Radhakrishna, S.K. Kumar, G. Belfort, Stability of Proteins on Hydrophilic Surfaces, *Langmuir*. 31 (2015) 1005–1010. <https://doi.org/10.1021/la503865b>.
- [43] P. Shah, N. Sridevi, A. Prabhune, V. Ramaswamy, Structural features of Penicillin acylase adsorption on APTES functionalized SBA-15, *Microporous and Mesoporous Materials*. 116 (2008) 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.03.030>.
- [44] P. Villeneuve, Lipases in lipophilization reactions, *Biotechnology Advances*. 25 (2007) 515–536. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.06.001>.
- [45] C. Bernal, F. Guzman, A. Illanes, L. Wilson, Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts, *Food Chemistry*. 239 (2018) 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.105>.
- [46] M.C. Bourkaib, S. Delaunay, X. Framboisier, L. Hôtel, B. Aigle, C. Humeau, Y. Guiavarc'h, I. Chevalot, N-acylation of L-amino acids in aqueous media: Evaluation of the catalytic performances of *Streptomyces ambofaciens* aminoacylases, *Enzyme and Microbial Technology*. 137 (2020) 109536. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109536>.
- [47] M. Lazghab, K. Saleh, P. Guigon, Functionalisation of porous silica powders in a fluidised-bed reactor with glycidoxypyltrimethoxysilane (GPTMS) and aminopropyltriethoxysilane (APTES), *Chemical Engineering Research and Design*. 88 (2010) 686–692. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2009.11.005>.
- [48] O. Olkhovyk, M. Jaroniec, Periodic Mesoporous Organosilica with Large Heterocyclic Bridging Groups, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 60–61. <https://doi.org/10.1021/ja043941a>.
- [49] J.L. Blin, R. Bleta, J. Ghanbaja, M.J. Stébé, Fluorinated emulsions: Templates for the direct preparation of macroporous–mesoporous silica with a highly ordered array of large mesopores, *Microporous and Mesoporous Materials*. 94 (2006) 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2006.03.023>.
- [50] C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance, *Advanced Synthesis & Catalysis*. 353 (2011) 2885–2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>.
- [51] K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquérol, T. Siemieniewska, Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems With Special Reference

to the Determination of Surface Area and Porosity, (n.d).  
<http://www.degruyter.com/view/IUPAC/iupac.57.0007> (accessed March 11, 2020).

[52] C. Carteret, J. Jacoby, J.L. Blin, Using factorial experimental design to optimize biocatalytic biodiesel production from *Mucor Miehei* Lipase immobilized onto ordered mesoporous materials, *Microporous and Mesoporous Materials*. 268 (2018) 39–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.04.004>.

[53] D. Jung, C. Streb, M. Hartmann, Covalent Anchoring of Chloroperoxidase and Glucose Oxidase on the Mesoporous Molecular Sieve SBA-15, *Int J Mol Sci*. 11 (2010) 762–778.  
<https://doi.org/10.3390/ijms11020762>.

## 5.2 Contribution de l'article

L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* suite à leur immobilisation par physisorption sur des supports silicatés méso-poreux (SBA15) et méso-macroporeux (MMS). L'influence de la modification des propriétés de surface de ces supports sur le taux d'immobilisation, sur les performances catalytiques des enzymes immobilisées et sur leur stabilité lors du recyclage a été étudiée afin de sélectionner le support le plus adapté.

Initialement, les deux types de supports ont été utilisés pour l'immobilisation sans modification de surface afin d'étudier leurs caractéristiques. La détermination des propriétés physiques des matériaux a mis en évidence la présence de structures mésoporeuses hexagonales caractéristiques des SBA15, contrairement aux MMS qui ont présenté une structure mésoporeuse de forme non-définie. L'analyse en microscopie électronique à balayage et de porosité au mercure a montré une répartition non homogène de la taille des pores des MMS avec une dominance des macro-pores permettant d'avoir une surface spécifique et un volume poreux plus importants que les SBA15. Ceci permet une bonne accessibilité des pores de MMS aux enzymes, se traduisant par un taux d'immobilisation plus important (autour de 4%) qu'avec les matériaux mésoporeux (SBA15) (environ 3%). L'évaluation des performances catalytiques des enzymes immobilisées a montré la présence d'une activité hydrolytique de l' $\alpha$ -acétyl-lysine similaire pour les deux supports. En termes de stabilité lors des cycles de recyclage, les enzymes immobilisées sur SBA15 ont présenté une meilleure stabilité que celles immobilisées sur les MMS. Cette perte d'activité après recyclage est certainement liée à l'importante désorption des enzymes liée aux faibles interactions de ces dernières avec le support qui font principalement appel à des liaisons hydrogènes ou de Van der Waals. De plus, la présence de macro-pores dans le cas des MMS a facilité le relargage de l'enzyme vers le milieu réactionnel causant une désorption plus importante. Afin de tenter d'améliorer les interactions de l'enzyme avec les supports, une modification des propriétés de surface des matériaux utilisés par greffage de l'APTES a été réalisée.

Les deux types de supports ont été fonctionnalisés avec de l'APTES à différents pourcentages, afin d'étudier l'effet de ce dernier sur le taux d'immobilisation et sur l'activité enzymatique. Les résultats ont montré une augmentation du taux d'immobilisation des enzymes sur les deux supports proportionnellement à l'augmentation du taux d'APTES de 0 à 10 % puis une stabilisation de la quantité immobilisée. Cette augmentation a été reliée à l'introduction de groupements propyle qui augmentent le caractère hydrophobe de surface permettant une plus

forte interaction avec les résidus hydrophobes de l'enzyme. La présence des groupements amines de l'APTES permet aussi d'accentuer les interactions de type électrostatique (entre les  $\text{NH}_3^+$  de l'APTES et les résidus chargés négativement de la surface de l'enzyme) et hydrogène entre l'enzyme et le support (figure 5.1). Lors de l'utilisation des supports silicatés non fonctionnalisés, le support est en grande majorité chargé négativement ce qui favorise la répulsion électrostatique par implication des résidus acides présent en surface de l'enzyme (Kołodziejczak-Radzimska et al., 2018). Une augmentation progressive de l'activité des enzymes immobilisées sur les SBA15 avec l'augmentation du taux d'APTES a aussi été observée. Cette augmentation de l'activité pourrait être liée à une meilleure orientation du site actif de l'enzyme vers le milieu réactionnel permettant une meilleure accessibilité du substrat. Par contre, les performances des enzymes immobilisées sur les MMS fonctionnalisés n'ont pas montré la même tendance avec très peu d'accroissement de l'activité, même si le taux d'immobilisation était supérieur comparativement aux MMS non fonctionnalisés par APTES. En termes de stabilité, une désorption moins importante des enzymes immobilisées sur les supports fonctionnalisés a été observée après la première utilisation. Toutefois, après deux recyclages, les quantités d'enzyme adsorbée sur les différents SBA15 fonctionnalisés et non-fonctionnalisés étaient similaires. Afin de tenter de remédier à ce problème, une condensation des enzymes après leurs immobilisation par la formation de CLEAs (cross-linked enzyme aggregates) a été réalisée. Cette dernière étape a été réalisée par l'utilisation de différents pourcentages de glutaraldéhyde. Les résultats ont montré une diminution progressive de l'activité des enzymes immobilisées avec l'augmentation du taux de glutaraldéhyde. Cette perte d'activité est probablement due à une dénaturation de l'enzyme après formation de liaisons covalentes entre le glutaraldéhyde et l'enzyme. En effet, la formation de CLEAs d'aminocyclases libres de *S. ambofaciens* a aussi été réalisée de la même manière. Cela a conduit à une perte totale de l'activité enzymatique.

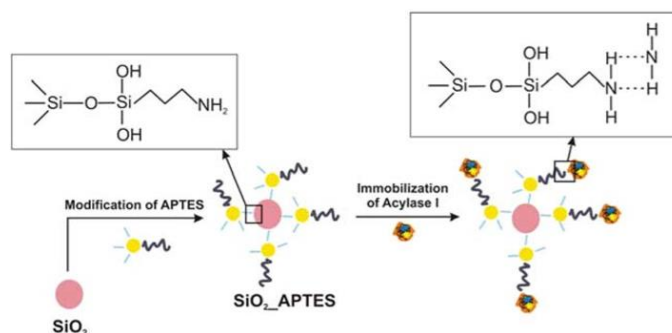


Figure 5.1 : schéma des interactions hydrogènes possibles entre les fonctions amines de l'APTES et l'enzyme (Kołodziejczak-Radzimska et al., 2018)

Cette étude a permis d'évaluer l'influence de la taille des pores et de l'augmentation du caractère hydrophobe de la surface des matériaux siliceux sur l'activité et la stabilité des enzymes immobilisées. Les résultats montrent clairement l'influence positive de l'augmentation du caractère hydrophobe du support sur les interactions enzyme / support. L'évaluation de l'activité enzymatique a montré de meilleures performances des enzymes immobilisées sur les SBA15 fonctionnalisés avec de l'APTES à 50%. Cependant, ces résultats ne permettent pas d'envisager l'utilisation de ces catalyseurs pour la production de molécules d'intérêt car l'activité de ces enzymes sous forme immobilisée reste faible par rapport à leur forme libre. Toutefois, la démarche suivie peut être utilisée pour l'évaluation de l'utilisation de supports d'autres natures et propriétés. Afin de compléter ces résultats, d'autres types de supports ont été étudiés.

### 5.3 Résultats complémentaires

#### 5.3.1 Performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* immobilisées sur différents supports silicatés

L'étude des performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* immobilisées sur les supports mésoporeux (SBA15) et méso-macroporeux (MMS) ayant montré une influence de la taille des pores sur le taux d'immobilisation et sur l'activité enzymatique, d'autres types de supports de porosités différentes ou sans porosité ont été utilisés. Certains auteurs ont rapporté l'importance d'avoir une taille de pores au minimum deux fois plus importante que le diamètre des enzymes afin d'assurer une bonne accessibilité du substrat à l'enzyme et de faciliter le transfert du produit de la réaction (Cao, 2005c). A cet effet, les matériaux macroporeux siliceux appelés SiHIPE (High Internal Phase Emulsion) peuvent présenter un intérêt pour l'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens*. Les SiHIPE ont été synthétisés par les partenaires du projet suivant la méthode décrite dans la littérature (Backov, 2012a). La caractérisation de la distribution de la taille des pores de ces supports a montré une très faible méso-porosité, déterminée par la méthode BJH, et une très forte macroporosité, déterminée par l'évaluation de la porosité au mercure et observée par microscopie électronique (Figure 5.2 et 3). Ces supports présentent une surface spécifique de 1033 m<sup>2</sup>/g, ce qui est plus important que celle des supports mésoporeux (SBA15 ; 650 m<sup>2</sup>/g) et méso-macroporeux (MMS ; 802 m<sup>2</sup>/g). Cela signifie qu'une très grande partie du squelette du matériau est représentée par des macropores (estimé à 93%).

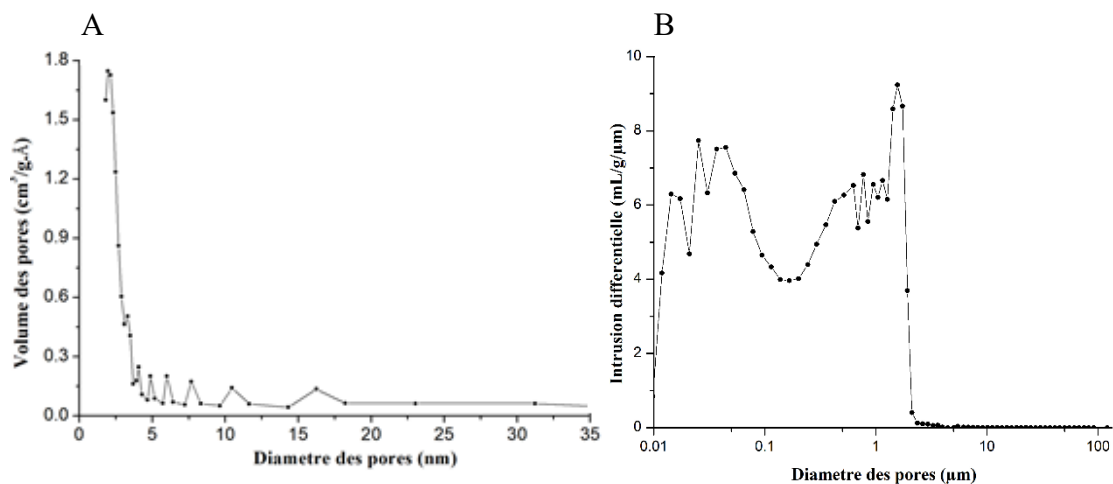


Figure 5.2 : distribution de taille des mésopores par la méthode BJH (A) et des macropores par l'analyse de porosité au mercure (B) des SiHIPE

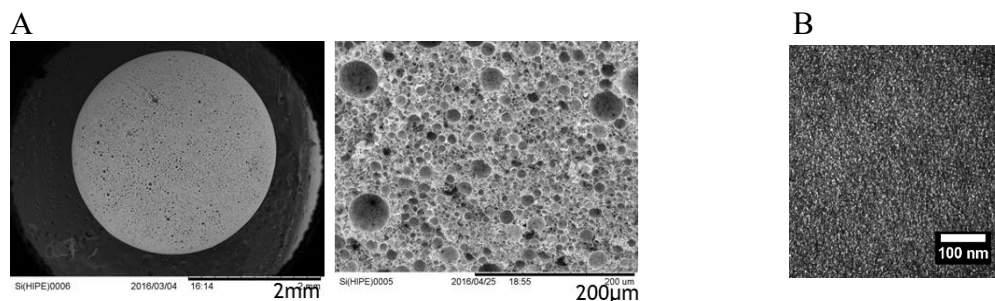


Figure 5.3 : observation en microscopie électronique à balayage (A) et à transmission (B) des SiHIPE

Un autre type de support a aussi été élaboré pour l'immobilisation des aminoacylases. Il s'agit d'un support hybride présentant à la fois des méso-pores semblables à ceux des SBA15 en termes de taille et d'organisation et des macropores similaires à ceux des SiHIPE avec une surface intermédiaire entre les deux (Roucher et al., 2018b). Les caractéristiques de ces matériaux méso-macroporeux innovants appelés SBA-Si-HIPE et leurs méthodes de production ont été décrites par Roucher et al. (2018).

Ces deux types de supports ont été utilisés pour l'immobilisation par adsorption des aminoacylases de *S. ambofaciens*, dans les mêmes conditions que pour les supports SBA15 et MMS décrites précédemment afin de pouvoir comparer les résultats. Les résultats des taux d'immobilisation sont présentés sur la figure 5-4-A. La quantité d'enzyme immobilisée dépend clairement de la taille des pores : l'augmentation du diamètre des pores s'accompagne d'un taux d'immobilisation plus important, ce qui est logique. En effet, la présence d'une porosité plus importante et d'une plus grande surface conduit à une amélioration de la diffusion de l'enzyme à l'intérieur des pores qui va pouvoir tapisser une surface plus importante. La comparaison des deux matériaux méso-macroporeux montre un taux d'immobilisation deux fois plus important

sur les SBA-si-HIPE que sur les MMS. Plusieurs paramètres peuvent être à l'origine de ces résultats. Les mésopores des SBA-si-HIPE présentent une organisation et une taille homogène de structure hexagonale, permettant une répartition similaire des enzymes au niveau des pores contrairement aux MMS qui présentent une répartition de taille hétérogène des mésopores. Cette homogénéité de taille de pores peut aussi réduire la désorption des enzymes au cours de l'immobilisation, augmentant ainsi le taux d'immobilisation. La quantité d'enzyme immobilisée sur les SBA-si-HIPE est presque similaire à celle obtenue avec les Si-HIPE. L'activité hydrolytique de l' $\alpha$ -acétyl-lysine des enzymes immobilisées a été ensuite mesurée et comparée aux activités des enzymes immobilisées sur les SBA15 et MMS.

La détermination de l'activité d'hydrolyse de l' $\alpha$ -acétyl-lysine par les enzymes immobilisées a été réalisée en adaptant la quantité de support ajoutée afin de placer l'équivalent de 1 g/L de protéines dans le milieu réactionnel, en tenant compte du taux d'immobilisation. Les résultats de l'activité hydrolytique après 24h des enzymes immobilisées sur les différents matériaux, sont représentés dans la figure 5-4-B : l'activité des enzymes immobilisées reste très faible par rapport à celle de l'enzyme libre. L'activité hydrolytique des enzymes immobilisés sur les Si-HIPE et les SBA-si-HIPE est similaire mais moins importante que l'activité observée avec les supports SBA15 et MMS. Ce résultat peut être expliqué par des problèmes de diffusion du substrat vers l'enzyme soit à cause d'une immobilisation au cœur des pores du matériau ou par l'obstruction des pores par accumulation des enzymes à l'entrée. L'orientation des enzymes immobilisées peut aussi être la raison de cette faible activité. Malgré ces résultats, les supports ont pu être recyclés deux fois, et des réactions d'hydrolyse de l' $\alpha$ -acétyl-lysine ont été mises en œuvre afin d'évaluer la stabilité de ces enzymes immobilisées. Les résultats sont représentés dans la figure 5-4-C. Pour les Si-HIPE, une perte d'activité très importante a été mise en évidence d'un cycle d'hydrolyse à l'autre. Cette perte d'activité est principalement liée à la désorption des protéines immobilisées ; la détermination de l'activité spécifique (activité déterminée sur la base de la quantité de protéine restant adsorbée sur le support) montre une relative stabilité de cette activité spécifique (environ 80%). L'introduction de mésopores sur ce support (SBA-si-HIPE) a permis une amélioration de l'adsorption de l'enzyme au niveau des pores, ce qui signifie que les pertes d'activité sont principalement liées à une dénaturation de l'enzyme au cours des cycles d'hydrolyse. L'activité de synthèse de l' $\alpha$ -lauroyl-lysine des enzymes immobilisées sur ces deux supports a aussi été évaluée. Les résultats n'ont pas montré d'apparition de produit après 48 h de réaction.

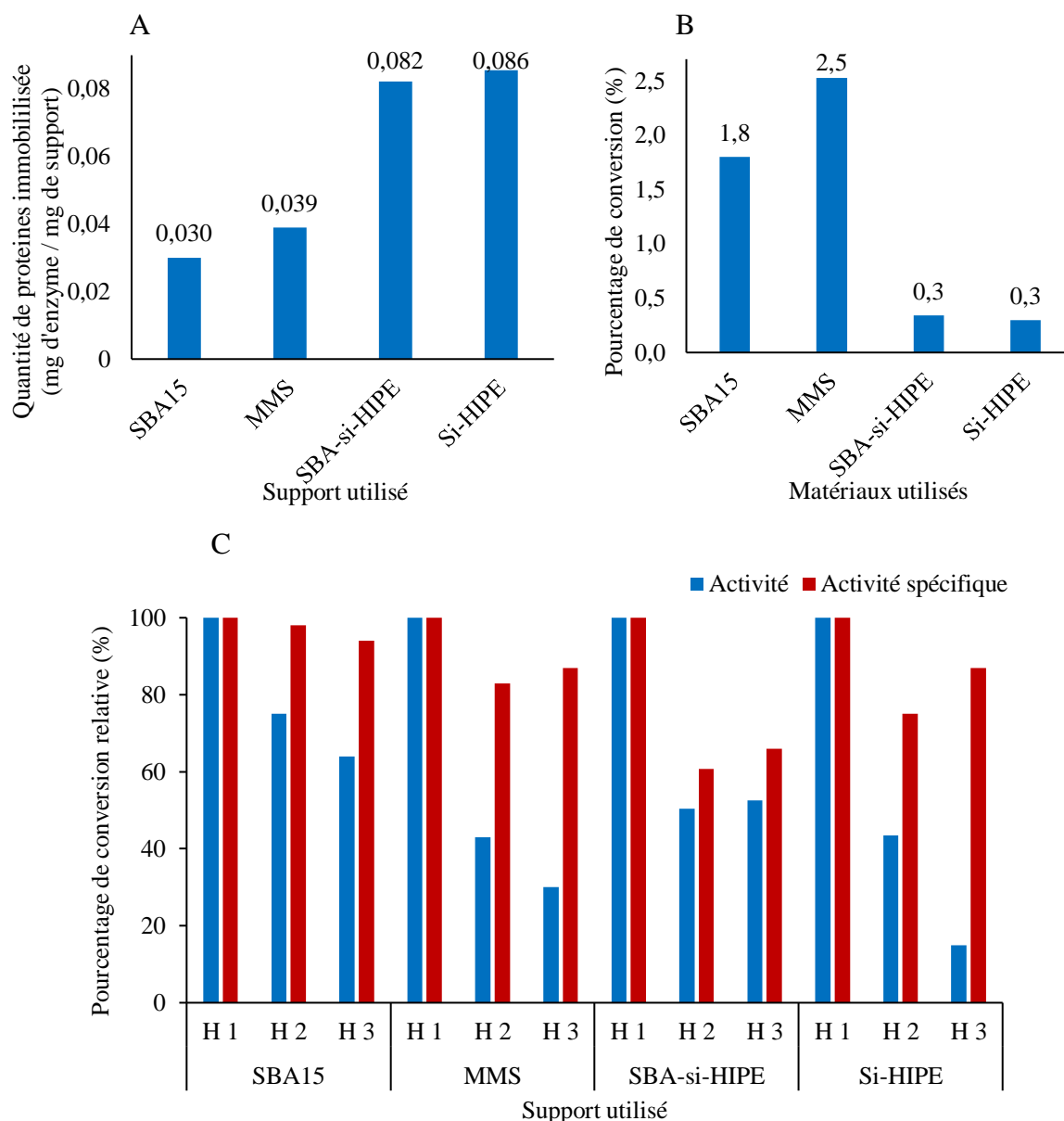


Figure 5.4 : quantité d'enzyme immobilisée sur les différents types de support (A), taux de conversion de l'  $\alpha$ -acétyl-lysine en lysine (B) et suivi de l'évolution de l'activité suite à 2 recyclages des enzymes immobilisées (C). H : cycle d'hydrolyse de l'  $\alpha$ -acétyl-lysine en lysine

Vu les faibles activités obtenues, un autre type d'immobilisation a été réalisé. Il s'agit de l'immobilisation par encapsulation des aminoacylases de *S. ambofaciens* dans une double émulsion. Cette immobilisation a été réalisée par les partenaires du projet ANR suivant la méthode décrite dans la littérature (Blin et al., 2014b). En résumé, elle est réalisée en introduisant l'enzyme lors de la première étape de production de l'émulsion eau dans l'huile qui sera par la suite utilisée pour la formation de la double émulsion, laquelle sera séchée à l'étuve à la fin pour récupérer la poudre finale. Les enzymes étant piégées à l'intérieur du support, le rendement d'immobilisation est de 100% avec un taux d'immobilisation de l'ordre de 0.04 mg protéine / mg de matériau. Les supports ainsi produits ont été évalués en termes



d'activité hydrolytique de l' $\alpha$ -acétyl-lysine et de stabilité au recyclage et leurs performances ont été comparées à celles des MMS (figure 5-5-A). A la première utilisation des enzymes immobilisées dans les doubles émulsions, l'activité enzymatique était 7 fois plus importante que celle des enzymes immobilisées sur les MMS. Cela peut être expliqué par la présence d'enzymes sous forme libre, piégées à l'intérieur du matériau, ce qui améliore l'accessibilité du substrat au site actif et sans changement de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Par contre, les enzymes immobilisées par adsorption nécessitent l'ancrage de l'enzyme à la surface du support par des interactions faibles (liaison hydrogène, hydrophobes, Van der Waals), ce qui peut modifier la conformation de l'enzyme, avec un risque d'obstruction du site actif lors d'une mauvaise orientation de l'enzyme à la surface. L'évaluation de la stabilité de l'enzyme a été réalisée en recyclant le support deux fois. Les résultats montrent une très faible stabilité de l'enzyme au recyclage avec une perte de 80 % de l'activité dès le premier recyclage, suivie d'une perte presque totale d'activité enzymatique (figure 5-5-B). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Même si les aminoacylases sont piégées à l'intérieur du support, ce qui réduira leur relargage, l'agitation par un barreau aimanté à une vitesse d'agitation de 600 rpm génère un cisaillement assez important, pouvant endommager la structure de la double émulsion, libérant ainsi les enzymes qui seront éliminées lors des étapes de lavage entre chaque recyclage. Afin de vérifier cela, la quantité d'enzyme libérée après chaque réaction a été mesurée en utilisant différentes méthodes de quantification des protéines (Bradford et BCA). Cependant, les résultats n'ont pas pu être exploités liés certainement à la présence des molécules qui composent la double émulsion (telles que le tensioactif) et qui semblent interférer avec ces méthodes de dosage protéique, donnant des résultats aberrants. La deuxième hypothèse pouvant expliquer cette perte d'activité peut être liée à une inactivation de l'enzyme au cours du temps. Cette hypothèse est effectivement possible si l'on considère le fait que les enzymes immobilisées par encapsulation sont assez libres, retrouvant ainsi la problématique de la faible stabilité thermique et de l'inactivation au cours du temps de l'enzyme libre décrite dans le chapitre 4 et qui sera détaillée dans le chapitre 6. Globalement, les enzymes immobilisées par adsorption sur les supports MMS ont présenté une meilleure stabilité de l'activité spécifique. Ces résultats sont très similaires à ceux décrits par Blin et al. (2014) lors de l'immobilisation de la lipase de *Mucor miehei* dans une double émulsion similaire. Les résultats avaient montré une très bonne activité de ces enzymes lors de la première utilisation puis une forte perte des performances enzymatiques lors de la production de biodiesel dans de l'hexane. Les enzymes immobilisées sur les SBA15 présentaient une meilleure stabilité.

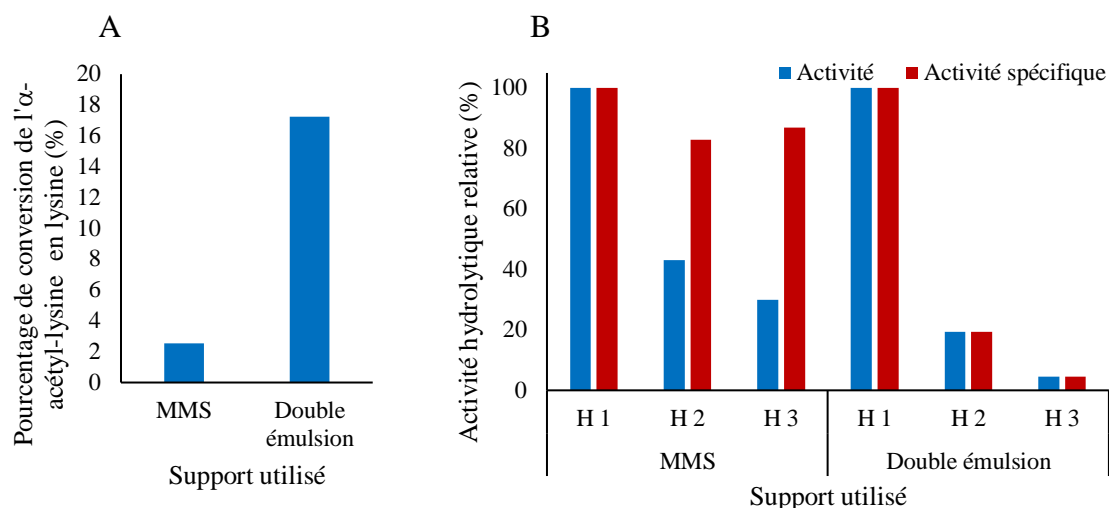


Figure 5.5 : taux de conversion de l'α-acétyl-lysine en lysine (A) et activité hydrolytique relative suite à 2 recyclages des enzymes immobilisées, H : cycle d'hydrolyse de l'α-acétyl-lysine en lysine

Les enzymes immobilisées par encapsulation dans la double émulsion ont été évaluées lors de la synthèse de l'α-lauroyl-lysine par acylation de la lysine avec de l'acide laurique. Les résultats des analyses HPLC et LC-MS n'ont pas montré d'apparition de produit contrairement aux analyses obtenues avec les enzymes immobilisées sur les MMS pour lesquelles une conversion similaire à celle observée en hydrolyse a été mesurée. L'absence d'activité de synthèse peut être expliquée par des problèmes de transfert de substrat vers l'enzyme et/ou du produit vers le milieu externe. En effet, les substrats introduits lors de la réaction sont sous forme d'émulsion préparée préalablement par sonication. Bien que la taille des pores soit estimée autour de 8 nm, il est fort possible d'avoir des interactions entre l'émulsion, le substrat et le matériau (double émulsion) et ainsi une réduction de transfert du substrat vers l'enzyme et le site actif ainsi qu'un colmatage de l'entrée des pores. D'autres auteurs ont aussi observé une faible activité enzymatique lors de la synthèse de l'ε-oleoyl-lysine catalysée par la lipase de *Mucor miehei* dans de l'hexane liée à une possible interaction entre l'acide gras et le support hydrophobe empêchant l'accès du substrat à l'enzyme (Montet et al., 1990). Vu les pertes importantes de l'activité hydrolytique lors du recyclage, malgré les fortes activités observées initialement et l'absence d'activité de synthèse, la stratégie d'immobilisation par encapsulation dans les doubles émulsions a été mise à l'écart. D'autres types d'immobilisation sur les supports macroporeux (Si-HIPE) par chimisorption ont aussi été envisagés en utilisant des molécules telles que l'isocyanate, glymo et glutaraldéhyde mais aucune activité résiduelle de l'enzyme n'a pu être mise en évidence. Les résultats décrits dans cette partie sont résumés dans le tableau 5-1.

Chapitre V : Performances des acylases de *S. ambofaciens* immobilisées

Tableau 5-1 : tableau de synthèse des résultats de l'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* sur les différents supports

Support	Méthode	Taux d'immobilisation (% = mg protéine / 100 mg de support)	Performances catalytiques (% d'hydrolyse de l' $\alpha$ -acétyl-lysine)	Remarques
SBA 15 (mésoporeux)	Physisorption directe ou après fonctionnalisation avec de l'APTES	* 3% (support non traité) * augmentation en fonction du % d'APTES (jusqu'à 6% avec 25 % APTES)	* 0,54 % (support non traité) * augmentation du taux de conversion avec l'augmentation du % d'APTES jusqu'à 11,5% avec 25 % APTES)	- augmentation de l'activité avec l'augmentation du % d'APTES : meilleure exposition et bonne orientation de l'enzyme - recyclage : perte d'activité progressive liée à la désorption
MMS (mésomacroporeux)	Physisorption directe ou après fonctionnalisation avec de l'APTES	*4% (support non traité) * augmentation en fonction du % d'APTES (jusqu'à 9,5% avec 10 % APTES)	* 1,43 % (support non traité) * faible augmentation en fonction du % d'APTES (jusqu'à 2,5% avec 10 % APTES)	- faible influence du taux d'APTES : obstruction probable des pores par l'enzyme - recyclage : perte d'activité progressive liée à la désorption
SBA 15 -si-HIPE (mésomacroporeux)	Physisorption	* 8,2 %	* 0,3 %	- faible activité : soit due à une obstruction des pores par accumulation des enzymes à l'entrée des pores ou à une mauvaise orientation des aminoacylases immobilisées - recyclage : désorption moins importante des enzymes
Si-HIPE (macroporeux)	Physisorption	*8,6 %	* 0,3 %	- faible activité : soit liée à des limitations diffusionnelles par accumulation des enzymes au cœur des pores ou à une mauvaise orientation des aminoacylases immobilisées - recyclage : désorption très importante des enzymes
Emulsion double	Encapsulation	*4 %	* 17 %	- très bonne activité catalytique : présence d'enzymes piégées mais libres au cœur de la double émulsion (maintien de la flexibilité de l'enzyme ?) - recyclage : perte très importante de l'activité due soit à un relargage de l'enzyme ou à une inactivation de l'enzyme présente sous forme libre

Au regard des faibles performances des aminoacylases de *S. ambofaciens* immobilisées sur les supports poreux à base de silice, liées principalement à une perte d'activité de ces enzymes, l'intérêt des supports silicatés innovants développés dans cette étude a été évalué avec une autre enzyme de type CALB. En effet, cette enzyme est connue pour sa bonne résistance et sa stabilité lors de l'immobilisation contrairement aux aminoacylases de *S. ambofaciens*.

### 5.3.2 Performances de la lipase B de *C. antarctica* immobilisée sur différents supports silicatés

L'immobilisation de CALB a été entreprise sur les différents supports silicatés développés par les partenaires du projet. Comme il a été montré dans le chapitre 3 que cette enzyme catalysait peu les réactions de N-acylation d'acides aminés, une autre réaction d'acylation a été choisie. Le choix s'est porté sur l'acylation d'une molécule d'intérêt cosmétique, déjà décrite dans la littérature qui est l'acylation du géraniol. Il a également été choisi de réaliser ces réactions en milieu  $s\text{CO}_2$  afin d'éviter d'employer un solvant organique.

Les réactions de O-acylation de composés apolaires sous  $s\text{CO}_2$  ont été largement étudiées et décrites dans la littérature en particulier pour la production d'arômes et d'ingrédients pour la cosmétique (Knez et al., 1998 ; Dos Santos, Rezende, et al., 2016b ; Bezbradica et al., 2017 ; dos Santos et al., 2017 ; Dias et al., 2018b ; Nyari et al., 2018 ; Knez, 2018b). C'est donc la synthèse de l'acétate de géraniol qui est un ester de monoterpène (géraniol) obtenu soit par extraction via distillation de certaines huiles essentielles végétales (geranium, lemongrass, palmarosa, rose, ...) ou par condensation chimique du géraniol et de l'acide acétique qui a été choisie comme modèle réactionnel. L'acétate de géraniol présente plusieurs activités telles qu'anti-inflammatoire et antimicrobienne et est très utilisée dans les produits cosmétiques et détergents auxquels elle donne une note olfactive florale et fruitée à la fois. La production enzymatique d'acétate de géraniol a aussi été étudiée dans différents milieux non-aqueux dont le  $\text{CO}_2$  supercritique en utilisant des lipases immobilisées en réacteur batch (Chulalaksananukul et al., 1993) mais aussi en réacteur continu à lit fixe (Peres et al., 2003 ; Couto et al., 2011). Afin de disposer d'une référence pour comparer les performances de CALB immobilisée sur différents supports, une étude préliminaire a été réalisée avec CALB commerciale Lipozyme<sup>®</sup> 435 : cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le journal « Process Biochemistry » et intitulé « Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations » présenté en annexe 5 (Bourkaib et al., 2018, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.008>). Plusieurs supports et méthodes d'immobilisation ont été par la suite évalués dans les conditions de

fonctionnement (55°C et 200 bars) permettant de maintenir une bonne activité et d'éviter une dénaturation rapide de CALB.

Lors de cette étude, CALB a été immobilisée par chimisorption au regard du risque élevé de désorption de l'enzyme immobilisée par physisorption décrit précédemment lors de l'immobilisation des aminoacylases. Le support mésoporeux a été fonctionnalisé avec différents organosilanes afin d'identifier le plus adapté à l'immobilisation covalente de CALB. A cet effet, du glutaraldéhyde (Glu), du (3-Glycidyloxypropyl) triméthoxysilane (Glymo) et de l'isocyanate (Iso) ont été utilisés à une concentration de 5 mmol / g de support. Dans tous les cas le taux d'immobilisation obtenu était de l'ordre de 0,05 g de CALB / g de support. Les enzymes ainsi immobilisées ont été étudiées via la réaction de synthèse de l'acétate de géraniol sous scCO<sub>2</sub> à 55°C et 200 bars, suivi d'une dépressurisation rapide. Une deuxième réaction successive dans les mêmes conditions a été réalisée afin de vérifier la stabilité de l'enzyme. Les analyses en GC-MS des produits de la réaction ont montré une très faible activité des enzymes immobilisées par rapport à l'enzyme commerciale (figure 5.6.A). Par ailleurs, il est à noter que la préparation liquide commerciale de CALB utilisée pour l'immobilisation est composée d'une grande quantité de sorbitol et de glycérol (50 %), utilisés comme conservateurs et stabilisants (figure 5.6.B). Ces molécules peuvent soit s'introduire au niveau des pores ou s'adsorber à l'entrée des mésopores, limitant ainsi l'accès aux substrats, ce qui se traduirait par un très faible taux de conversion. Ces résultats peuvent donc être expliqués par des limitations diffusionnelles des substrats vers l'enzyme par implication de ces stabilisants malgré l'importante diffusivité du scCO<sub>2</sub> qui est semblable à celle d'un gaz. Afin de remédier à ce problème, une étape de standardisation a été mise en place afin d'éliminer ces molécules. Il s'agit d'une filtration membranaire de la solution d'enzyme commerciale, diluée par dix, suivie de deux étapes de dia-filtration, après reprise du rétentat dans de l'eau, par l'utilisation d'un système de filtration tangentielle d'un seuil de coupure de 10kDa. Les enzymes en environnement aqueux standardisées ont ensuite été immobilisées sur les mêmes types de supports. Selon les résultats présentés dans la figure 5.6.A, les taux de conversion observés avec les greffons Glu et Glymo étaient similaires avec ou sans standardisation. Les faibles activités observées dans ces conditions pourraient être liées soit à une dénaturation de l'enzyme lors du greffage par liaisons covalentes sur les organosilanes ou bien à un encombrement stérique de l'accès des pores par l'enzyme, la haute surface spécifique disponible dans les mésopores n'étant alors pas valorisée comme souhaitée. Il est possible que la ou les premières lipases immobilisées de manière covalente à l'entrée des pores de moins de 8 nm après ajout des greffons organiques (Glu, Glymo, Iso) empêchent les molécules de lipases suivantes de pénétrer à l'intérieur des pores

pour s’y fixer correctement. La limitation de transfert des substrats dans la porosité des SBA15 est, elle, peu probable, car ces substrats sont de petites tailles et le CO<sub>2</sub> supercritique est presque aussi diffusif qu’un gaz. Il est donc envisageable que la fonctionnalisation des SBA 15 se fasse surtout en surface externe des particules de SBA 15, ne protégeant à nouveau pas les lipases des violentes décompressions de 200 bars à l’atmosphère, sans réelle protection de la porosité qui ne serait pas valorisée. En revanche, une augmentation du taux de conversion d’un facteur 5 a été observée en utilisant la solution de CALB après standardisation et immobilisée sur les supports fonctionnalisés avec de l’isocyanate. Cela confirme la possible implication des stabilisants présents dans la solution initiale d’enzyme dans les faibles activités observées avant standardisation. L’activité enzymatique observée dans ce cas était environ 1,5 fois celle de l’enzyme commerciale dans les mêmes conditions mais contrairement au support commercial, une forte baisse de l’activité a été observée lors du deuxième cycle de synthèse sous CO<sub>2</sub> supercritique. Cette perte d’activité est probablement liée à une désorption des enzymes du support lors de la décompression intermédiaire entre les deux cycles, ce qui tendrait à montrer que seule une partie des enzymes considérées comme immobilisées de manière covalente l’était vraiment et qu’une grande partie des enzymes était en fait simplement « adsorbée » en surface des SBA15 fonctionnalisées. Les produits de la réaction interagissant avec les différents tests de détermination de la quantité d’enzyme, la quantification des enzymes désorbées n’a pas pu être réalisée. Les faibles activités observées peuvent aussi être dues à la formation de liaisons covalentes entre l’enzyme et le support qui induit un changement conformationnel de l’enzyme.

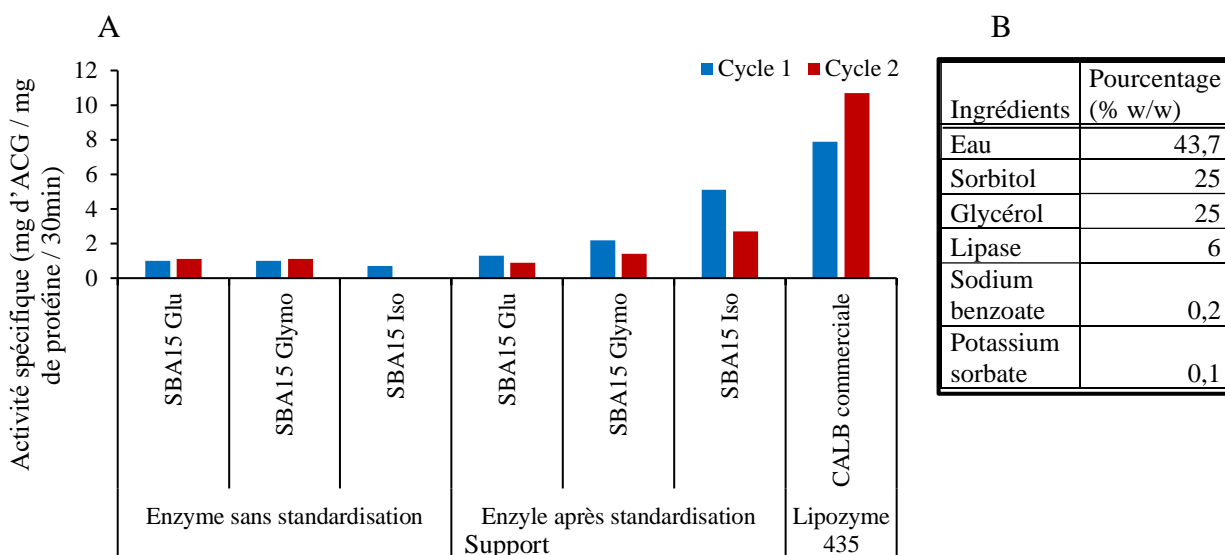


Figure 5.6 : A. Activité de CALB immobilisée sur les différents SBA15 fonctionnalisés vs CALB commerciale immobilisée par adsorption sur des supports de polyméthacrylate divinylbenzène macroporeux (cycle : une réaction de synthèse de l’acétate de géranol sous scCO<sub>2</sub> à 55°C et 200 bar suivi d’une dépressurisation rapide) B. composition de la solution de lipase utilisée pour l’immobilisation sans standardisation.

Une autre stratégie d'immobilisation sur les supports siliceux mésoporeux qui a été largement rapportée dans la littérature, est la fonctionnalisation de ces matériaux avec des groupements en utilisant du triéthoxy(phényl)silane (Kato, Seelan, 2010 ; Bernal et al., 2017 ; Gama et al., 2019). Cette fonctionnalisation permet de rendre la surface du support plus apolaire, favorisant les interactions hydrophobes de l'enzyme avec le support et permettant une meilleure stabilisation sans formation de liaisons covalentes. Boros et al. (2013) ont utilisé cette stratégie pour l'immobilisation de CALB sur des supports mésoporeux en silice. Ils ont montré que CALB immobilisée présentait de meilleures performances et une meilleure stabilité après adsorption sur ces supports, comparativement à l'immobilisation par interactions covalentes (Boros et al., 2013). Dans notre étude, les supports SBA15 ont été fonctionnalisés avec 5 mmol de triéthoxy(phényl)silane / g d'SBA 15 avant de réaliser l'immobilisation par adsorption de CALB. Les supports utilisés présentaient une surface spécifique de 539 m<sup>2</sup>/g et un volume poreux de 0,7 cm<sup>3</sup>/g, avec un diamètre moyen de pores de 8,5 nm. Les enzymes ont été immobilisées par adsorption et leur activité de synthèse de l'acétate de géraniol sous scCO<sub>2</sub> à 55°C et 200 bars a été mesurée sur 2 cycles séparés d'une dépressurisation. Les résultats sont présentés sur la figure 5.7.A. L'activité des enzymes immobilisées sur les supports SBA15 phényl était légèrement inférieure à celles des enzymes immobilisées sur SBA15 fonctionnalisés avec de l'isocyanate mais avec une meilleure stabilité que ces dernières. Cette faible activité pourrait être liée à une mauvaise orientation de l'enzyme adsorbée. En effet, selon la structure 3D de CALB (figure 5.7.B), la face de l'enzyme comprenant le site actif présente une surface très hydrophobe et qui est la plus susceptible d'interagir avec la surface du support contenant les groupements phényles. Ceci pourrait engendrer une limitation de l'accessibilité du substrat vers le site actif réduisant ainsi le taux de conversion. Dans tous les cas, l'activité et la stabilité se sont révélées moins importantes que celles observées en utilisant l'enzyme CALB commerciale Lipozyme® 435 où la lipase est pourtant immobilisée de manière non covalente, sur une surface elle aussi hydrophobe, ceci sans perte d'activité entre les cycles et donc sans lessivage même lors des phases de décompression.

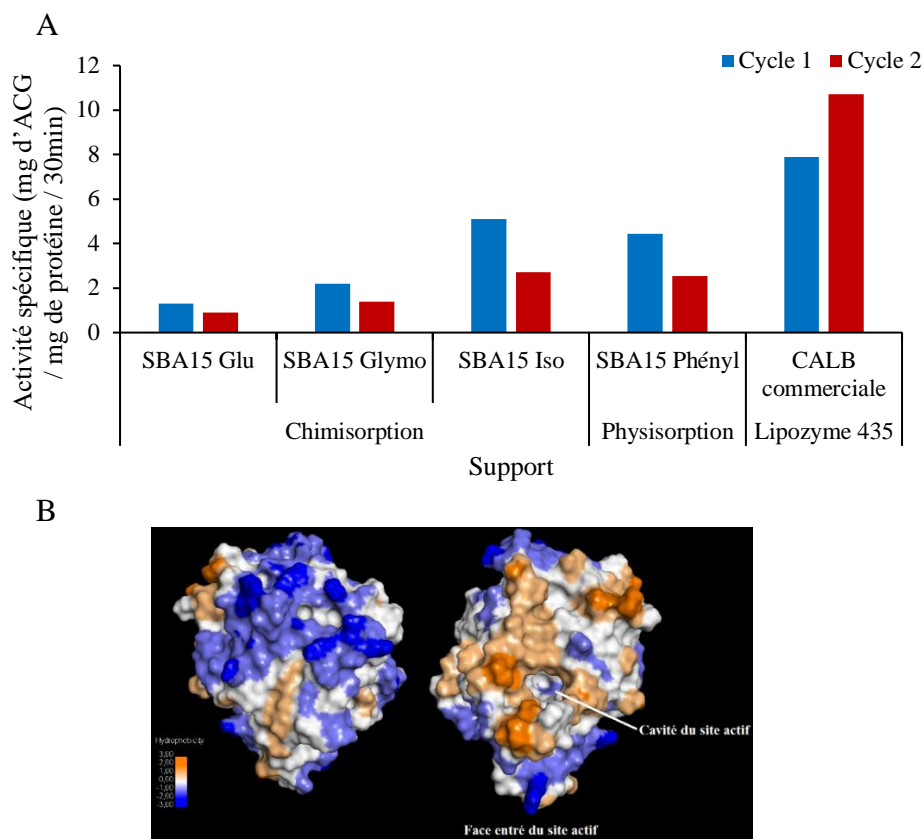


Figure 5.7 : A. Activité de CALB immobilisée sur les différents supports SBA15 fonctionnalisés vs CALB commerciale immobilisée sur des supports de méthacrylate divinylbenzène macroporeux (cycle : une réaction de synthèse d'acétate de géranol sous  $scCO_2$  à 55°C et 200 bars suivie d'une dépressurisation rapide), B. image de la structure 3D des deux faces de CALB obtenue par l'utilisation du logiciel Discovery studio

Il est fort probable que le faible diamètre des pores des SBA15 contribue fortement à leur obstruction partielle par les lipases immobilisées à leur entrée réduisant ainsi le contact site actif de CALB / substrats, malgré la forte diffusivité et la faible viscosité du  $CO_2$  véhiculant les substrats dans les pores. Les limitations diffusionnelles potentiellement externes ou internes dans les mésopores pouvant être la cause principale des faibles performances catalytiques obtenues avec CALB immobilisée en surfaces des SBA15, l'utilisation de supports macroporeux tels que les Si-HIPE décrites précédemment peuvent présenter un avantage de par leur importante surface spécifique ( $1033 \text{ m}^2/\text{g}$ ) dont une fraction importante est liée à la présence de macropores (diamètre de pore supérieur à 50 nm). Cela pourrait permettre une meilleure accessibilité aux enzymes comme aux substrats et ainsi contre carrer les problèmes rencontrés avec les supports mésoporeux SBA15.

Au regard des meilleures performances observées avec les supports SBA15 fonctionnalisés avec de l'isocyanate par rapport aux autres types de fonctionnalisation, l'isocyanate a été utilisé pour l'immobilisation de CALB par chimisorption sur des monolithes de si-HIPE. Ces



monolithes ont permis de retrouver une très bonne efficacité de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* après une immobilisation par chimisorption (Backov, 2012a).

Les monolithes ont été fonctionnalisés avec de l'isocyanate à différentes concentrations (2,5 et 5 mmol / g de support nommés ISO 2,5 et ISO 5) afin d'évaluer l'influence des conditions de fonctionnalisation du support sur l'activité enzymatique. Sur ces supports, l'enzyme CALB a été immobilisée et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec l'enzyme commerciale. La quantité de lipases immobilisées sur les monolithes fonctionnalisés avec 5 mmol d'isocyanate était plus importante que celle immobilisée sur les supports fonctionnalisés avec 2,5 mmol (0,075 et 0,055 mg de CALB / mg de support, respectivement). Cette augmentation de la quantité d'enzyme immobilisée est due à la présence de plus de groupements fonctionnels permettant l'établissement de davantage de liaisons covalentes avec le support. Ces deux enzymes supportées ont été évaluées pour leur activité de synthèse de l'acétate de géraniol sous  $\text{scCO}_2$  à 55°C et 200 bars suivie d'une dépressurisation rapide. Les supports ont été recyclés 3 fois successivement, en réalisant des réactions de synthèse dans les mêmes conditions. Les résultats (figure 5.8) ont montré que l'enzyme CALB immobilisée sur les supports ISO 2,5 présente une activité spécifique beaucoup plus importante que sur les supports ISO 5. Ce résultat pourrait être expliqué par un effet inhibiteur de l'isocyanate, quand il est introduit en excès, sur l'activité enzymatique. D'autre part, les performances catalytiques de l'enzyme CALB immobilisée sur les monolithes fonctionnalisés (ISO 2,5) étaient supérieures à celles de l'enzyme de référence. Du point de vue de la stabilité enzymatique, une faible perte d'activité a été enregistrée surtout après le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> cycle, ce qui peut être dû à une désorption d'une certaine quantité d'enzymes immobilisées. Plusieurs paramètres peuvent expliquer l'amélioration de l'activité enzymatique suite à l'immobilisation sur les supports macroporeux fonctionnalisés avec de l'isocyanate. L'utilisation de supports macroporeux permet de réduire considérablement les limitations diffusionnelles des substrats vers l'enzyme immobilisée et de maintenir une bonne flexibilité de cette dernière. Il a été rapporté qu'afin d'avoir une bonne activité enzymatique, il est considéré comme nécessaire que le diamètre des pores soit beaucoup plus important que celui de l'enzyme ( $2 * \text{le diamètre de l'enzyme} + 2 * 20 \text{ nm}$  soit dans notre cas environ 50 nm c'est à dire le domaine des macropores) (Cao, 2005a). Il est par ailleurs préférable que l'enzyme forme une seule couche sur le support afin de faciliter l'accès des substrats à l'enzyme ainsi que sa stabilité (Cao, 2005a). Vu les faibles taux d'immobilisation observés sur le support ISO 2,5 (0,055 mg de CALB / mg de support) et la faible quantité d'isocyanate (2,5 mmol d'isocyanate / g de support) qui permet une plus large dispersion des groupement fonctionnels, contrairement au supports ISO 5, l'apparition d'une monocouche

d'enzymes est très probable, permettant d'augmenter l'activité. Han et al, (2005) ont évalué les performances de CALB immobilisée sur des mousses méso-cellulaires qui sont des supports à base de silice avec des pores interconnectés de 25 nm et d'une surface spécifique d'environ 500 m<sup>2</sup>/g. Ils ont démontré que les enzymes immobilisées présentaient de meilleures performances que la CALB commerciale Novozyme 435 (Han et al., 2006b). Ces résultats sont très prometteurs pour le développement de procédés en continu d'acylation de composés sous scCO<sub>2</sub>. Ces résultats préliminaires mériteraient une étude plus approfondie pour mieux caractériser ces enzymes supportées.

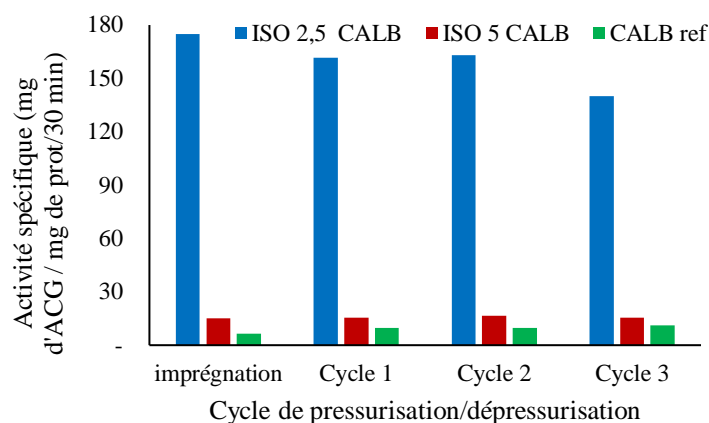


Figure 5.8 : Activité de CALB immobilisée sur les monolithes fonctionnalisés avec de l'isocyanate à différentes concentrations vs Lipozyme 435® (cycle : une réaction de synthèse de l'acétate de géranol sous scCO<sub>2</sub> à 55°C et 200 bars pendant 30 min suivi d'une dépressurisation rapide)

D'autres types de supports ont aussi été utilisés : c'est le cas des supports à base de carbone tels que les graphènes et les nanotubes de carbone qui ont été déjà décrits pour l'immobilisation des enzymes, en particulier des lipases (Prlainović et al., 2011 ; Wee et al., 2019 ; Tan et al., 2019a). Ce sont des structures nanométriques rigides formées d'un ou de plusieurs feuillets, ce qui permet d'avoir une surface externe par unité de masse ou volume très importante (autour de 1300 m<sup>2</sup> / g). Cette caractéristique en plus de l'absence de pores, qui réduit le risque de problème diffusionnels des substrats, font de ces matériaux des supports très attractifs, au moins sur le plan fondamental, pour l'immobilisation d'enzymes (Feng, Ji, 2011). La surface de ces supports est très hydrophobe mais on peut facilement réduire cette forte hydrophobie par fonctionnalisation chimique (oxydation) afin de pouvoir rendre ces matériaux carbonés dispersibles en phase aqueuse tamponnée et réduire le risque de dénaturation des enzymes immobilisées par physisorption (Pavlidis et al., 2010b ; Radhakrishna et al., 2013). Dans notre cas, les nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNT : multiwalled carbon nanotubes) ont été utilisés pour l'immobilisation de CALB par physisorption et par chimisorption après

modification de la surface du support en contrôlant l'équilibre hydrophobie/hydrophilie de surface. L'activité et la stabilité des lipases immobilisées ont été mesurées et comparées via des synthèses d'acétate de géraniol sous scCO<sub>2</sub> en réacteur à lit fixe. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Catalysis Today » sous le titre « Non-covalent and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on chemically modified multiwalled carbon nanotubes for a green acylation process in supercritical CO<sub>2</sub> » (annexe 6). Cependant, les performances catalytiques ont dans tous les cas été moins importantes que celles de CALB commerciale (Lipozyme 435®).

En résumé, les résultats des performances de CALB immobilisée sur les différents supports sont synthétisés dans le tableau 5-2.

Chapitre V : Performances des acylases de *S. ambofaciens* immobilisées

Tableau 5-2 : tableau récapitulatif des résultats de l'immobilisation de CALB sur les différents supports

Support	Méthode	Taux d'immobilisation (% = mg protéine / 100 mg de support)	Performances catalytiques (M d'acétate de géraniol / M de CALB / min)	Remarques
Lipozyme 435®	N.D.	14%	45	Voir annexe 5
Nanotubes de carbone (non poreux)	Physisorption et chimisorption (EDC et NHS)	16 % (physisorption) 21 % (chimisorption)	2,7 (physisorption) 11,5 (chimisorption)	Voir annexe 6 - performances catalytiques plus faibles que celle de CALB commerciale (Lipozyme 435®) - recyclage : désorption importante dans les deux cas d'immobilisation reliée à l'exposition des enzymes immobilisées au flux de CO <sub>2</sub>
SBA15 (mésoporeux)	Chimisorption (glutaraldéhyde, glymo, isocyanate)	5%	7,4 (SBA15 Glymo) 12,5 (SBA15 Glu) 29,0 (SBA15 Iso)	- meilleure activité des enzymes immobilisées sur les SBA15 fonctionnalisés avec de l'isocyanate mais inférieure à celle de Lipozyme435® liée à des probables limitations diffusionnelles du substrat vers l'enzyme - recyclage : perte d'activité après la première utilisation liée à une désorption des enzymes mal fixées par liaison covalente ou par une inactivation enzymatique
SBA15-phényle (mésoporeux)	Physisorption	5%	19,6 (SBA15 Phényle)	- faible activité liée à une probable orientation inadéquate de l'enzyme sur le support hydrophobe - recyclage : meilleure stabilité de l'activité enzyme reliée à une désorption moins importante
Si-HIPE (macroporeux)	Chimisorption (isocyanate à différentes concentrations)	5,5 % (ISO 2,5) 7,5 % (ISO 5)	967,1 (ISO 2,5) 85,3 (ISO 5)	- activité enzymatique très supérieure à celle de l'enzyme commerciale, en particulier après immobilisation sur les supports fonctionnalisés avec 2,5 mmol / g d'isocyanate, reliée à une très bonne accessibilité des substrats au site actif de l'enzyme - recyclage : très bonne stabilité de l'activité enzymatique reliée à une faible désorption de l'enzyme

## 5.4 Conclusion

L'objectif de ce chapitre était la sélection du support et de la méthode la plus adaptée à l'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* permettant de maintenir leur activité et une bonne stabilité. Plusieurs supports siliceux avec des diamètres de pore différents, dont des supports mésoporeux (SBA15), mésomacroporeux (MMS et SBA-si-HIPE) et macroporeux (SI-HIPE) ont été évalués. La comparaison des performances des enzymes immobilisées sur les différents supports a montré une augmentation progressive de la quantité d'enzymes immobilisées avec une augmentation de la taille des pores. Ce résultat est probablement dû à un meilleur transfert de matière vers l'intérieur des pores permettant ainsi l'immobilisation de l'ordre de 8,5 % d'enzyme par unité de surface en utilisant les Si-HIPE. La présence de structure mésoporeuse organisée au niveau des supports méso-macroporeux (SBA-si-HIPE) a permis une augmentation d'un facteur 2 de la quantité d'enzyme immobilisée s'expliquant par une meilleure stabilisation des enzymes au niveau des méso-pores. Par ailleurs, l'évaluation de l'activité hydrolytique ne suit pas cette logique (tableau 5.1). Les MMS suivi des SBA15 ont présenté la meilleure activité et stabilité par rapport aux autres supports. Cette faible activité observée avec les supports MMS pourrait être liée à une mauvaise orientation de l'enzyme à la surface et / ou à des limitations diffusionnelles du substrat vers l'enzyme. Les supports mésoporeux et méso-macroporeux ont été modifiés en réalisant une fonctionnalisation avec de l'APTES à différents pourcentages, afin d'augmenter graduellement le caractère hydrophobe de la surface et de davantage favoriser les interactions de type liaison hydrogène. Dans le cas des deux supports, cette modification a permis une amélioration des interactions enzyme / support qui s'est traduite par une augmentation graduelle de la quantité d'enzyme immobilisée jusqu'à un taux d'APTES de 10%. Par ailleurs, les performances catalytiques des enzymes immobilisées sur les deux types de supports ont été différentes. L'augmentation du taux de fonctionnalisation a permis une amélioration de l'activité enzymatique lors d'une immobilisation sur les supports SBA15 contrairement aux supports MMS. A l'issue de ces résultats, il apparaît que les supports mésoporeux SBA15 fonctionnalisés avec de l'APTES sont les plus adaptés pour l'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* ; cependant, l'activité enzymatique rest faible par rapport à celle des enzymes libres. C'est pourquoi d'autres études plus approfondies sur l'utilisation de matériaux à base de silice ou carbone avec une optimisation de la surface de ces supports par greffage d'autres groupements fonctionnels devront être entreprises pour aboutir à un procédé en continu de synthèse d'acides aminés acylés plus compétitif. L'étude *in-silico* par méso-modélisation des interactions enzyme / support pourrait être également envisagée afin de faire un screening préalable et d'identifier les supports

les plus adaptés, tout en limitant le nombre d'expérimentations. En effet, la connaissance de la structure de l'aminoacylase cible serait un apport important au développement d'une démarche rationnelle de choix de support, en connaissant mieux les propriétés de surface des protéines, notamment aux abords du site actif.

Etant donné les faibles performances des aminoacylases immobilisées, une évaluation des performances de CALB immobilisée sur les mêmes types de support a été réalisée. Au regard des très faibles performances des lipases pour la réaction de N-acylation des acides aminés sous scCO<sub>2</sub> à cause de la non compatibilité de ce solvant avec les composés hydrophiles et surtout les amines, une réaction de O-acylation a été prise comme référence pour l'étude des performances des lipases immobilisées. Initialement, les performances de CALB commerciale immobilisée sur des supports de méthacrylate divinylbenzène macroporeux ont été évaluées pour la réaction de synthèse d'acétate de géraniol sous scCO<sub>2</sub>. Cette étude a permis de démontrer l'efficacité de CALB pour cette réaction et de montrer qu'une bonne maîtrise des conditions de procédés pouvait permettre d'obtenir de très bons taux de conversion (98±2 %) sans utilisation de solvant organique et sans effluent à retraiter et une excellente stabilité catalytique de la lipase. Ce travail préalable, publié dans Process Biochemistry (annexe 5) a servi de base de comparaison dans le cadre d'autres investigations portant sur l'immobilisation de lipases sur différents types de supports. Les supports siliceux mésoporeux ordonnés (SBA15) ont été utilisés pour l'immobilisation par chimisorption de CALB en utilisant différents organosilanes. Parmi les organosilanes utilisés, les enzymes immobilisées sur les SBA15 fonctionnalisées avec de l'isocyanate ont présenté de meilleures performances mais avec une faible stabilité et une activité sensiblement inférieure à celle de CALB commerciale. Cette observation a été reliée à de possibles limitations diffusionnelles dans les pores ainsi qu'à l'obstruction possible des pores par les premières molécules de lipase immobilisée, limitant l'accessibilité des substrats au site actif. A cet effet, des supports macroporeux (diamètre de pore supérieur à 50 nm) ont été utilisés pour l'immobilisation de la lipase permettant un meilleur accès de ces dernières à la surface des macropores et un transfert de matière (substrats et produits) très fortement amélioré au cœur de cette macroporosité. Les résultats de la synthèse de l'acétate de géraniol par CALB immobilisée sur les monolithes macroporeux de Si-HIPE fonctionnalisés avec 2,5 mmoles d'isocyanate / g de support ont ainsi montré des performances catalytiques bien supérieures à celles de CALB immobilisée commerciale (tableau 5.2). L'étude a aussi montré l'effet inhibiteur d'une fonctionnalisation avec une concentration trop importante d'isocyanate. Au regard de ces résultats prometteurs, il sera intéressant

d'approfondir l'étude sur l'immobilisation des lipases sur les supports macroporeux afin de développer un procédé de O-acylation de composés à intérêt industriel sous  $scCO_2$ . Des supports non poreux à base de carbone (nanotubes de carbone) ont aussi été élaborés l'immobilisation par physisorption et par chimisorption a été réalisée (annexe 6). L'avantage de ces supports est la présence d'une surface spécifique élevée ( $1500 \text{ m}^2 / \text{g}$  de support) et une immobilisation sur la surface externe permettant un meilleur contact enzyme / substrat. L'étude de CALB immobilisée sur ces supports carbonés par physi- ou chimi-sorption a montré que les performances étaient moins importantes que celles de CALB immobilisée sur les supports à base de silice.

En conclusion, une immobilisation efficace des aminoacylases de *S. ambofaciens* aurait permis le développement de procédés intensifiés de N-acylation des acides aminés par l'utilisation de réacteurs à lit fixe ou de synthèse en continu. Malheureusement, dans le cadre de cette thèse, les immobilisations des aminoacylases de *S. ambofaciens* se sont toutes révélées pas ou peu convaincantes. C'est pourquoi, à ce jour, l'usage des aminoacylases de *S. ambofaciens* sous forme libre reste le plus adapté à la synthèse de lipoaminoacides (LAA) ou lipopeptides (LPP) d'intérêt en phase aqueuse. C'est pourquoi il a été choisi d'étudier la synthèse d'un acide aminé acylé particulier, d'intérêt industriel catalysée par les aminoacylases de *S. ambofaciens* sous forme libre. L'intensification de la réaction de synthèse de l'undécénoyl-phénylalanine qui est un acide aminé acylé à intérêt cosmétique et pharmaceutique important puisqu'il est à la fois un bio-tensioactif biosourcé facilement biodégradable et éco-compatible mais également un actif cosmétique utilisé comme éclaircissant cutané par inhibition de la synthèse de mélanine par les mélanocytes de la peau a donc été mise en œuvre et est présentée dans le chapitre suivant.





CHAPITRE V : MISE EN ŒUVRE D'UN PROCÉDÉ DE  
PRODUCTION ET DE PURIFICATION DE L'UNDÉCÉNOYL-  
PHÉNYLALANINE

---



## 6 Chapitre VI : mise en œuvre d'un procédé de production et de purification de l'undécénoyl-phénylalanine

### 6.1 Introduction

Les travaux décrits dans les deux chapitres précédents avaient pour objectif principal de sélectionner l'enzyme la plus adaptée à la N-acylation des acides aminés et la le mode d'usage, libre ou immobilisé, de cette dernière. L'utilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* en milieu aqueux (tampon tris-HCl) sous forme libre s'est avérée la plus pertinente. Par ailleurs, peu d'informations sont disponibles sur l'influence des conditions de mise en œuvre du procédé sur les performances catalytiques de ces aminoacylases. En effet, les aminoacylases décrites dans la littérature présentent des conditions de mise en œuvre sensiblement différentes en raison de leur différence structurale même si elles sont issues de la même espèce microbienne (Koreishi et al., 2005b ; 2006b ; 2007b ; 2009). De plus, comme nous avons pu le mesurer, les performances catalytiques des enzymes varient selon leur affinité vis-à-vis d'un substrat donné. Ce dernier chapitre a donc pour objectif d'étudier les conditions de catalyse de la N-acylation de la phénylalanine pour la production du N-10-undecenoyl-phenylalanine (C11'F) et de mettre en place un procédé de purification de ce dernier en vue d'une évaluation de son activité biologique. Cette étude a ainsi pour objectif principal de caractériser et d'intensifier la réaction d'acylation d'acides aminés en particulier pour la production de bio-tensioactifs d'intérêt industriel dont le C11'F. D'autre part, il s'agira également d'évaluer l'activité biologique du lipoaminoacide produit par voie enzymatique et de comparer son activité biologique avec celle de la même molécule produite par voie chimique (par la méthode de Schoten-Baumann). Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication soumise au journal « Process Biochemistry ».

### 6.2 Evaluation des performances catalytiques des aminoacylases de *Streptomyces ambofaciens* pour l'acylation de la phénylalanine

Les surfactants non-ioniques tels que ceux issus de la N-acylation de la phénylalanine sont très utilisés dans les produits cosmétiques et d'entretien en raison de leurs propriétés de tension de surface et moussante. De plus, plusieurs études ont démontré l'efficacité de certains de ces bio-tensioactifs, tel que le C11'F, comme agents éclaircissants de la peau. Il a été montré que ce dernier inhibe la production de mélanine en agissant comme antagoniste à l'hormone mélanotrope (MSH pour Melanocyte Stimulating Hormone) de récepteurs spécifiques à la surface des mélanocytes (Bissett et al., 2009b). Cela augmente considérablement son intérêt pour une utilisation dans des produits cosmétiques tels que les crèmes éclaircissantes et les

crèmes solaire. La production de cette molécule à l'échelle industrielle se fait exclusivement par la voie chimique de Schotten-Baumann et aucune étude n'a, jusqu'à présent, décrit la possible synthèse enzymatique de ce lipoaminoacide. Nous avons donc choisi le procédé de production de cette molécule comme modèle pour une évaluation plus approfondie de l'influence des conditions opératoires (concentration en substrats, en produit, température, pH, ajout d'ions métalliques, volume de réacteur) sur les performances catalytiques des aminoacylases de *S. ambofaciens*. La stabilité thermique et l'effet inhibiteur du produit de la réaction sur l'activité enzymatique ont aussi été étudiés. Afin de pouvoir évaluer l'activité biologique du C11'F produit par voie enzymatique, un procédé de purification du produit a été mise en œuvre afin de pouvoir disposer d'environ 1 g de produit pur. En raison des propriétés physicochimiques très proches entre le C11'F et l'acide gras utilisé (acide undécénoïque ; C11'), l'obtention d'un produit pur a nécessité la mise en œuvre de différentes techniques de purification. L'activité biologique du produit issu de cette purification a été évaluée par le laboratoire Recherche et Développement de SEPPIC, partenaires du projet ANR ISEAPIM3.

## **Enzymatic synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine catalysed by aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens***

Mohamed Chafik Bourkaib<sup>1</sup>, Stephane Delaunay<sup>1</sup>, Xavier Framboisier<sup>1</sup>, Catherine Humeau<sup>1</sup>, Jérôme Guilbot<sup>2</sup>, Cecile Bize<sup>2</sup>, Estelle Illous<sup>2</sup>, Isabelle Chevalot<sup>1</sup>, Yann Guiavarch<sup>h1\*</sup>

### **Authors are affiliated to:**

<sup>1</sup>LRGP, UMR 7274 CNRS-Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, F-54518 - VANDŒUVRE Cedex, France

<sup>2</sup>R&D laboratory of Seppic, Air Liquide Healthcare Specialty Ingredients, 50 boulevard National - CS 90020 - 92257 La Garenne Colombes Cedex, France.

\*Author to whom correspondence should be addressed

☎: +33 (0)3 83 17 51 90

Fax : +33 (0)3 83 32 29 75

✉: [yann.guiavarch@univ-lorraine.fr](mailto:yann.guiavarch@univ-lorraine.fr)

**Short title:** "Enzymatic synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine"

### **Abstract:**

Due to its physico-chemical and biological activities, N-10-undecenoyl-phenylalanine (C11'F) is one of the most interesting lipoaminoacids used in cosmetic and pharmaceutical industries. Its production is currently based on the Schotten-Baumann chemical reaction, which shows some environmental issues in terms of effluents. As a possible biocatalytic alternative, this study presents the evaluation of the reactional and process conditions allowing the production of C11'F using aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* culture. These aminoacylases showed the best activity at 45°C and pH between 7 and 8 with a moderate thermal stability. The influence of substrates concentrations on the kinetic parameters of C11'F synthesis showed a more important impact of the phenylalanine concentration as compared to the 10-undecenoic acid concentration. As a reactional product, C11'F appeared to have an inhibitory effect on the enzymatic N-acylation. Cobalt addition allowed an eleven-fold increase of the reaction rate. Batch reactors were used with free aminoacylases without impact on the final C11'F concentration. For the first time, enzymatically produced C11'F was finally purified at the gram scale as a 99% purity white powder. The evaluation of the biological activity on melanocytes cultures showed the presence of skin lightening activity similar to the one obtained with the chemically produced C11'F.

## 1. Introduction :

Amino acids surfactants (AAS) are eco-compatible surface-active agent with very interesting techno-functional properties and, for some of them, with attractive bioactivities. There are molecules of choice for food, pharmaceutical and cosmetic industries [1]. Non-ionic AAS, like phenylalanine and leucine derivatives, are very attractive AAS as ingredients at industrial scale because of their good detergency and foaming properties [2,3]. In addition to these properties, phenylalanine-based surfactants were described as presenting cytotoxicity against several human cancer cells thus widening their application scope [4]. Bisset et al., 2009 described the ability of phenylalanine-fatty acid derivatives like N-10-undecenoyl-L-phenylalanine to reduce melanin production in melanocytes. In their study, an emulsion prepared by the combination of 1 % N-10-undecenoyl-phenylalanine with 5 % niacinamide increased significantly the efficiency in reducing the appearance of facial hyperpigmentation *in vivo* [5]. However, such AAS are produced at industrial scale using the Schotten-Baumann chemical reaction where the amino acid reacts with a fatty acid chloride under highly alkaline conditions by using NaOH in water and sulfuric acid to stop the reaction [4]. In some cases, some organic solvents are used to facilitate the reaction. In this last case a high purity powder with only some fatty acid traces is obtained. Despite a high yield of synthesis, the corresponding down-stream processing of the reaction medium leads to large volumes of saline effluents requiring an expensive reprocessing step for the industrials [6]. Nowadays, the environmental issues caused by such process encouraged the authorities to promote the industrial development of sustainable technologies by switching from waste remediation and pollution control by end-of-pipe solution to waste prevention thus reducing the reprocessing cost [7]. Enzymes represent an alternative for such reactions to avoid by-products and salts generation. Enzymes were widely used for acylation reaction especially for O-acylation but much less for N-acylation of amino acids. The ability of some enzymes to perform the N-acylation of amino acids were studied by only few authors using free fatty acids [8–15]. Lipases and proteases are hydrolases that can perform the acylation reaction in non-aqueous media like organic solvents or in solvent-free conditions in order to shift the thermodynamic equilibrium of the reaction. However, the low solubility of amino acids in organic solvents limits the mass transfer of the substrates to the active site, which decreases the performance of the reaction [8,16,17]. In this context, the use of acylases like aminoacylases that are able to catalyse the N-acylation reaction in aqueous media with better solubility of the substrates, especially of the acyl acceptor, has been yet considered [18,19]. Several enzymes were evaluated for amidation reaction but much less for the N-acylation of

amino acids. The most used enzymes performing this reaction were described by Koreishi et al. who identified four acylases from *Streptomyces mobaraensis* [10,11,20,21]. Three of them were aminoacylases characterized as monomeric metallo-enzymes with different regioselectivities. Indeed, the aminoacylase of 100 kDa and the second one of 55 kDa (called Sm-AA) had regioselectivity towards the alpha amino group of the amino acid while the third one of 60 kDa (called Sm-ELA) was specific for the lysine epsilon amino group [10,12,20,21]. The fourth acylase was a penicillin V acylase (Sm-PVA), which is a dimeric enzyme able to perform the N-acylation of several amino acids with lauric acid showing a better activity with arginine, cysteine and lysine with a preference for the amino group in  $\Sigma$  position [11,22]. In another study, the ability of a crude extract from *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 to perform the N-acylation of lysine and peptides containing lysine on their alpha position was described [13]. By genome comparison, a very close sequence identity between the genes encoding Sm-AA, Sm-ELA and Sm-PVA from *S. mobaraensis* and the ones responsible for the acylation activity from *S. ambofaciens* was shown, with 86, 80 and 69 % sequence identity respectively. Another gene was also identified with 55% identity with Sam-AA (Sam-AA like) but this had a very low  $\alpha$ -acylation activity. In addition, the authors demonstrated that the enzyme similar to Sm-AA, named SamAA, was responsible of 85 % of the N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine hydrolysis activity [13]. However, no information is available until now about the condition influencing the activity of the acylases from *S. ambofaciens* ATCC23877. In a recent study, Bourkaib et al. (2020) described the substrate specificity of the crude extract of *Streptomyces ambofaciens* was investigated toward the 20 natural proteogenic amino acids and different fatty acids for the enzymatic synthesis of many AAS in water. In the same study authors also investigated the impact of some operational conditions on the production of alpha-lauroyl lysine in batch reactor [23]. They also compared the performance of the crude extract from the wild strain of *S. ambofaciens* and the one from a mutant strain which express only Sam-AA. The results showed that the substrates specificity was similar between both strains confirming the position that Sam-AA is responsible of the N- $\alpha$ -acylation activity of the crude extract from the wild strain *Streptomyces ambofaciens*.

At the difference of what was performed in [23] where, for the first time, we mainly evaluated the potential of Sam-AA to N-acylate the twenty proteogenic amino acids in one single condition, the original aim of the present work was to focus on the enzymatic preparative synthesis and purification of one AAS, the N-10-undecenoyl-phenylalanine (C11'F), using Sam-AA from a crude extract from *Streptomyces ambofaciens* culture, and to compare the

biological activity of the enzymatically produced C11'F with the one of the chemically produced C11'F. As above mentioned, the N-10-undecenoyl-phenylalanine (C11'F) is an AAS of direct industrial interest, largely used in cosmetics and pharmaceuticals as a skin lightening agent. To date, no study is reported on the preparative enzymatic synthesis and purification of this AAS in water, nor on the evaluation of its biological activity. This is also the first work of its kind in the field of AAS enzymatic synthesis. . . In this study, the influence of the operational conditions on the synthesis reaction of C11'F was investigated, including the use of various metallic divalent cations such as  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  or  $Co^{2+}$ , and their concentrations. An up-scaling of production using different reactor configurations as well as a convenient way to purify C11'F as a white powder and at the gram scale was also presented. The inhibition of melanin production of the purified product was evaluated using melanocyte cell line and compared to the activity of the chemically produced C11'F.

## **2. Materials and methods :**

### **2.1. Aminoacylases of *S. ambofaciens* production**

The production of aminoacylases from *S. ambofaciens* was performed as described in detail in [23]. Aminoacylases from *S. ambofaciens* were finally obtained as a protein crude extract whose specific activity was evaluated using a lauroyl-lysine synthesis reaction. For this reaction, lauric acid and L-lysine were used as substrates at equimolar concentration (100 mM) in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50mM, at pH 8 and 45°C at 500 rpm magnetic stirring (2 mL reaction volume) in a simple glass tube.

### **2.2. Enzymatic N-acylation of L-Phenylalanine assays**

The evaluation of the operational conditions influencing the activity of the crude extract of aminoacylases were conducted in test tubes of 2 mL final reaction medium containing 100 mM of each substrate (except for substrate concentration influence) and 1 g/L enzymes concentration (except for enzyme concentration influence) prepared in 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl buffer, at 45°C (except for temperature influence), pH 8 (except for pH influence) and 500 rpm magnetic agitation.

The influence of substrate concentration was investigated by using concentrations from 25 to 200 mM of L-phenylalanine and from 25 to 200 mM of 10-undecenoic acid setting the other substrate's concentration at 100 mM. The influence of the pH of the reaction was studied in the pH range [6-9.5] using NaOH 7.5 M and HCl 1 M to control the pH. Temperature effect on the



reaction was evaluated in two steps. The first one was the evaluation of the optimal temperature of the enzymes by performing the synthesis reaction in a temperature range of [30-55°C]. The second step was to evaluate the stability of the enzymes by performing the standard reaction after incubation at different temperature (37, 45 and 55°C) and during different incubation time (16 and 25 h). The enzymes concentration influence was evaluated by using (0.25, 0.5, 1 and 2 g/L) protein concentration at the standard conditions. The inhibition by the product of the reaction was investigated by adding different concentrations of a chemically produced commercial N-10-undecenoyl-phenylalanine. The relative activity was then calculated using the initials rates of the reactions with ( $V_{i\ C11'F}$ ) and without ( $V_{i0}$ ) the addition of the product (*relative activity* (%)) =  $\frac{V_{i\ C11'F}}{V_{i0}}$ .

We investigated the effect of metal ions by using 0.1 mM of CuCl<sub>2</sub> (from Fluka Chemika), CoCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> (from Sigma), and Ethylene-Diamine-Tetra-acetic Acid (EDTA) in the standard conditions. The influence of CoCl<sub>2</sub> concentration was evaluated by using CoCl<sub>2</sub> concentrations in the range [0-0.5 mM]. In all case, the reaction was started after one-night agitation, in order to check if there was a reaction without enzymes, by adding 1 g/L of the crude extract of aminocyclases from *S. ambofaciens*.

At appropriate times, 50 or 100 µL aliquot of the reaction mixture was withdrawn and diluted with 80% Methanol for HPLC-ELSD analysis. Finally, all reactions were stopped by freezing directly the mixture at -18°C. Each reaction run was performed at least twice.

### 2.3. Reactor configuration

Different batch reactor with different reaction medium volumes and agitation systems were also evaluated and compared to the classic batch reaction performed in a standard vessel filled with 2 mL of the reaction medium. The first one was a 100 mL glass spinner flask with double sidearms (Wheaton® 356875 Celstir®) used as reactor equipped with suspended magnetic agitation filled with 20 mL of reaction medium final volume. The second one was a reactor of 500 mL equipped with automatic pH, temperature and agitation monitoring (OptiMax, METTLER TOLEDO®). The agitation module consisted of a four blades propeller, upwards (M8) of 45 mm diameter and 45° tilt. The reactor was filled with 300 mL of final reaction medium. In both cases the reaction medium contained 100 mM of each substrate and 1 g/L enzymes concentration in 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl buffer, at 45°C, pH 8 and 500 rpm agitation. At appropriate times, 100 µL aliquot of the reaction mixture was withdrawn and diluted with 80% Methanol for HPLC-ELSD analysis. Finally, all reactions were stopped by

freezing directly the mixture at  $-18^{\circ}\text{C}$ . Each reaction was performed at least twice. The product of the reaction performed in the OptiMax was purified following the procedure described below.

#### **2.4. Purification of the final product:**

In order to get, for the first time, a pure enzymatically produced N-10-undecenoyl-phenylalanine, a purification process was developed. The 300 mL final reaction medium containing 1.53 g of the produced C11'F, residual 10-undecenoic acid (4.64 g) and L-phenylalanine (4.16 g) and the enzymes was used for the development of the purification protocol. The first stage was an ultrafiltration with a 10 kDa membrane (Amicon ultra-15; Merck) made of regenerated cellulose in order to eliminate small molecules coming from the aminoacylases crude extract. Two diafiltration steps and a 10-fold concentration step of the initial mixture were performed by centrifugation during 30 min and 5000 rpm, using a fixed angle rotor (Centrifuge 5804 R, Eppendorf). The second stage of the protocol consisted in removing the proteins by precipitation with methanol. To do this the 30 mL concentrated solution was diluted 10 times with a 80%/20% methanol/water solution. After 3 hours magnetic agitation the precipitated proteins were removed by centrifugation (20 min at 8400 rpm and  $15^{\circ}\text{C}$ ). The methanol present in the supernatant part was evaporated using a rotating evaporator (Laborota 4002 control, Heidolph, Germany). The third stage consisted in removing residual impurities and salts by size exclusion chromatography (BioSep<sup>TM</sup> SEC-S2000  $300 \times 21.2$  mm, 5  $\mu\text{m}$  particle diameter, Phenomex, USA). The elution of the 5 mL injected volume was performed using an isocratic system (45% acetonitrile) with a 5 mL/min flow rate, during 37 min. The mixture C11'/C11'F was collected after a 23 min elution time. The recovered mixture was then concentrated by evaporation for the next stage of purification by liquid chromatographic method. Different high pressure reverse phase liquid chromatography methods were tested using a "classical" C18 column (Grace/Alltech, Darmstadt, Germany,  $150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$  particle size) or less classical C30 phases (LC Acclaim<sup>TM</sup> C30,  $250 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$  particle size, ThermoFisher scientific, USA) and also a more specific phase containing phenyl functional groups on its surface (Force Biphenyl 5  $\mu\text{m}$ ,  $150 \times 2.1$  mm for analytic column and Ultra Biphenyl 5  $\mu\text{m}$ ,  $250 \times 21.2$  mm for preparative column, Restek, USA). However, the very close physicochemical properties of the product and the residual fatty acid, like hydrophobicity ( $\log P$  C11' = 3.99,  $\log P$  C11'F = 5.05), did not allow their proper separation. Also, although the biphenyl analytical scale column showed its capability to separate the two molecules with about 2 min difference in retention times, the same phase used in a preparative scale column did not

allow any separation anymore even after several different trials. Actually, normal phase chromatography using Kieselgel G 60 powder under atmospheric pressure appeared to be the most suitable method leading to the pure product. The mixture 50% cyclohexane/50% ethyl acetate was selected to elute the residual fatty acid, selectively. The product was then eluted by adding around 1% (v/v) acetic acid to the previous eluting system. The elimination of the residual fatty acid and the recovery of the product were followed using Kieselgel G 60 Plates and iodine chamber. The collected fractions containing the product were concentrated using a rotary evaporator and dissolved again in water for the lyophilisation step, leading to a white powder. The product purity was assessed by HPLC-ELSD, LC-MS and proton NMR analyses.

## 2.5. Analytical methods

### 2.5.1. Quantitative analyses by HPLC

We monitored the reaction conversion by using the same analytical method as the one previously described in [23], based on the use of an HPLC (LC 10 AD-VP, Shimadzu, France) equipped with a UV detector at 214 nm followed by a light-scattering low temperature evaporative detector (Shimadzu, France). Calibrations were performed using a chemically synthesized N-10-undecenoyl-phenylalanine named Sepiwhite<sup>TM</sup> MSH kindly provided by SEPPIC, France. The substrate conversion yield was determined using the following equation: conversion (%) =  $\left(\frac{[C11'F]_{\text{mol/L produced}}}{[C11']_{\text{mol/L initial}}}\right) \times 100$ . We calculated the initial rates of the reaction by using a third order polynomial model applied to the derivative of the first experimental data points exhibited in the figures. The maximum velocity ( $V_{\text{max}}$ ) and the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for each substrate were determined using a standard Michaelis-Menten model based on the equation of the graphic representing  $\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{S}\right) = \frac{1}{S} * \frac{K_m}{V_{\text{max}}} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$  where V is the initial rate and S is the substrate concentration.

### 2.5.2. Mass spectrometry analysis

We performed the qualitative and semi-quantitative analysis of N-10-undecenoyl-phenylalanine by using an HPLC-MS-MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a Linear Trap Quadrupole mass spectrometer (LTQ). An atmospheric pressure ionization interface operating in positive electrospray mode (ESI+) was used. The chromatographic separation and mass spectrometric conditions that were used as described in details in [23]. Raw data were processed using Xcalibur software program (version 2.1, <http://www.thermoscientific.com>).

## 2.6. Biological activity evaluation

The evaluation of the melanin production by melanocytes was performed using B16 murine melanoma cells (B16F1 cells) following the method described by Chung et al., 2019 with some adaptations [24]. B16F1 cells were maintained in a CO<sub>2</sub> incubator in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), without phenol red, supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Cells were incubated in CO<sub>2</sub> for 24 h after being seeded in 96-well plate (6000 cells/well). Then cells were treated with Sepiwhite™ MSH (SEPPIC) or enzymatic N-10-undecylenoyl-phenylalanine initially dissolved in ethanol or the culture medium. Two different concentrations of each was tested (10 and 50 µg/mL) and kojic acid at 50 µg/mL in the culture medium was used as a positive reference. 200 µL of the cell culture medium was transferred to a 96-well plate after 72h incubation. The absorbance of the samples and standard curve of synthetic melanin (0 to 500 µg/mL) was measured at 450 nm. The inhibition activity (%) was expressed as  $\frac{\text{concentration of melanin with the tested molecule}}{\text{concentration of melanin without tested molecule}} \times 100$ . In order to evaluate the cells viability, the latter were isolated and lysed in PBS buffer prior concentration determination using a protein assay kit (BCA Protein Quantitation Kit). The cells viability was expressed as  $\frac{\text{concentration of proteins with the tested molecule}}{\text{concentration of proteins without tested molecule}} \times 100$ . The measured melanin contents were then normalised by the protein amount and expressed as µg/mg of cell's proteins. The evaluation was done at least 5 times and the statistical analysis was done using Student test to compare the results with the control (XLSTAT software, Addinsoft Inc., Paris, France).

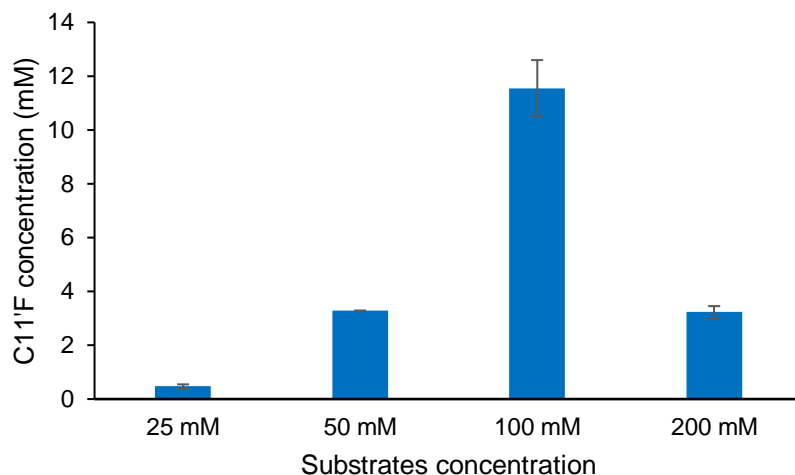
## 3. Results and Discussion

### 3.1. Influence of substrate concentration on enzymatic activity

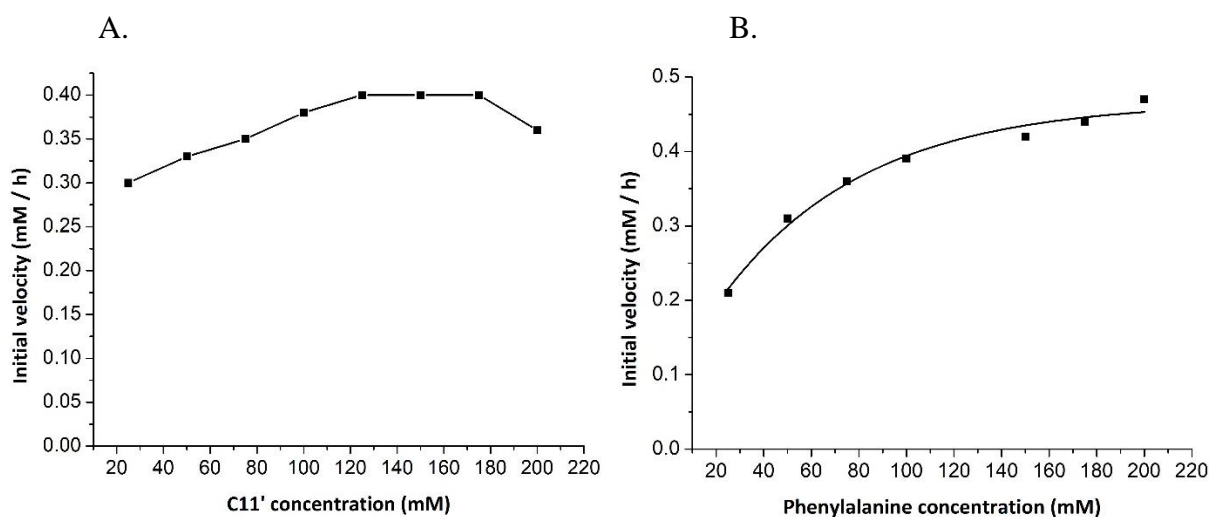
In a recent study [23], the ability of the aminoacylases from *S. ambofaciens* to catalyse the N-acylation of the amino acids on alpha amino group position was demonstrated. 10-undecenoic acid is a mono-unsaturated fatty acid described as having antifungal, antiviral and insect-repelling activity which makes it useful to treat superficial infections [25,26]. It was also described as having neuroprotective and radical-scavenging activity [27]. The N-undecyl-10-enoyl-L-phenylalanine (C11'F) generated by the condensation of the phenylalanine with the 10-undecenoic acid was described as having very interesting properties for cosmetic applications. However, the enzymatic synthesis of C11'F has never been reported. In order to study the operational conditions influencing the activity of the aminoacylases from *S.*

*ambofaciens* the synthesis of C11'F was used as reference reaction. In this study all experiments were carried out using the same crude extract from *S. ambofaciens* containing  $21 \pm 0.7$  g/L of proteins [28]. The apparent specific activity of the proteins crude extract was evaluated using lauroyl-lysine synthesis reaction performed with an equimolar concentration of the lauric acid and lysine (100 mM). The reaction was performed using 1 g/L of protein crude extract. The apparent specific activity of the acylases from *S. ambofaciens* was  $33.4 \pm 5$   $\mu\text{M}$  of  $\alpha$ -lauroyl-lysine / min / mg of proteins.

All N-acylation (amidation) reactions were carried out in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM pH 8, containing 1 g/L protein at  $45^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ . In order to evaluate the substrate concentration influence on enzyme activity different reactions were performed. First of all, the best substrate concentration, at equimolar conditions, was evaluated for the further parameters evaluation by using different concentration (25 mM, 50 mM, 100 mM and 200 mM). The concentration produced after 48 h (Fig.1) showed a maximum reaction by using 100 mM of both substrates while very low activity was observed in the other conditions. The influence of the substrate concentration on the performance of the aminoacylases from *S. ambofaciens* was then studied by fixing the concentration of one of the substrates at 100 mM and by varying the concentration of the other substrate from 25 mM to 200 mM. The influence of the concentration in 10-undecenoic acid was very low compared to the influence of phenylalanine concentration (Fig.2). The initial rate of the reaction was increased by the increase of the concentration of the fatty acid from 25 mM to 125 mM followed by a stabilization of the reaction rate. The evolution of the initial rate followed standard Michaelis-Menten model allowing the determination of  $K_m$  and  $V_{max}$  for the undecenoic acid. According to the equation of the graphic representing  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{S}\right)$   $V_{max}$  and  $K_m$  of around  $0.50 \pm 0.05$  mM / h and 19.2 mM were found. Above a C11' concentration of 175 mM a slight decrease of the activity was observed which can be due to a substrate inhibition. The influence of the amino acid was more pronounced than the fatty acid where a continuous increase of the initial rate was observed. Indeed, according to the equation of the graphic representing  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{S}\right)$   $V_{max}$  and  $K_m$  of around  $0.50 \pm 0.05$  mM / h and 42 mM were found. Koreishi et al., 2005 observed nearly the same relationship when performing the reaction of N $\alpha$ -Feruloyl-L-lysine synthesis using the aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*. They showed, like in this study, that the activity was almost unaffected by the concentration of the acyl donor. However, the effect of L-lysine concentration on the activity was positively much more important [20].



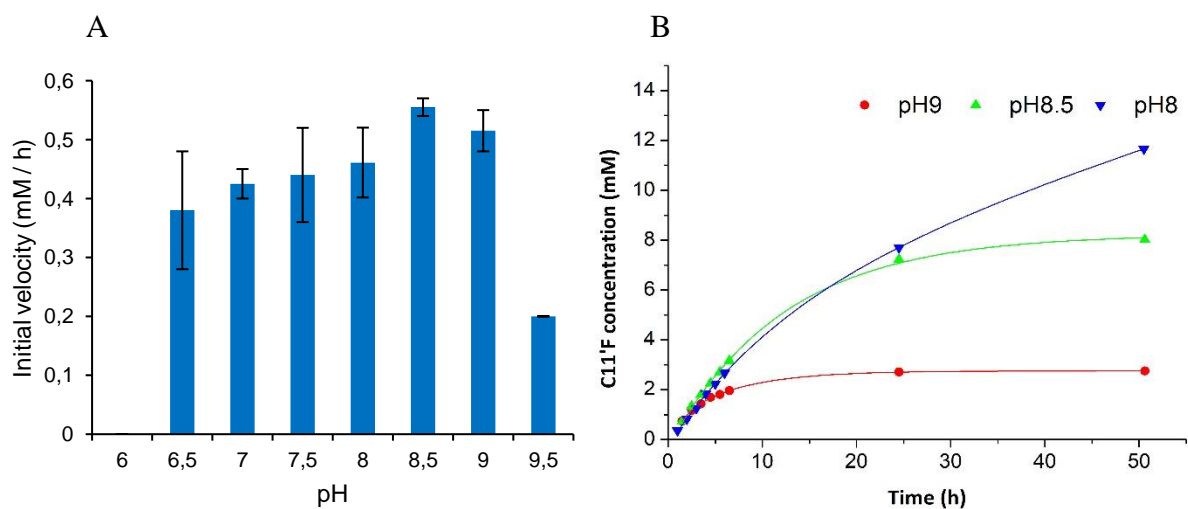
**Fig.1:** Influence of substrates concentration at equimolar condition on the synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine after 72 h in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50mM containing 1 g/L acylases crude extract at 45°C, pH 8 and 450 rpm magnetic agitation (n=2 or 3).



**Fig.2:** Influence of substrates concentration on the initial rate for the synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50mM containing 1 g/L acylases at 45°C, pH 8 and 450 rpm magnetic agitation, A. Effect of 10-undecenoic acid concentration on the initial rate of N-10-undecenoyl-phenylalanine synthesis reaction. A reaction mixture containing 0.025-0.2 M of 10-undecenoic acid and 100 mM L-phenylalanine. B. Effect of L-phenylalanine concentration on the initial rate of N-10-undecenoyl-phenylalanine synthesis reaction. A reaction mixture containing 100 mM 10-undecenoic acid and 0.025–0.2 M of L-phenylalanine (n=2).

### 3.2. Influence of the pH on aminoacylases activity

The pH of the reaction medium is one of the most important operational parameters affecting the performance of a reaction by changing even the ionisation state of the substrates and enzymes and, subsequently, the enzymes activity. The results showed that the activity remained nearly stable at pH range from 6.5 to 9 while no reaction was obtained at pH 6 and very low activity was measured at pH 9.5 (Fig.3 A). However, by following and comparing the kinetic of the reaction at pH 8-9 (Fig.3 B), the enzymes seems to be much less stable at pH 8.5 and 9 than at pH 8, which is very important in the perspective of an extrapolation. For this reason, the pH of all the reaction performed using the aminoacylases from *S. ambofaciens* at 45°C were set at a range of 7-8. Several studies evaluated the influence of the pH on the enzymatic activity and showed nearly the same pH range for optimum activity, which is widely used for industrial application. Koreishi et al. (2005, 2009), showed that the optimum pH of the aminoacylase (SmAA) from *Streptomyces mobaraensis* was between 7 and 8 while the second aminoacylase of 100 kDa had an optimum pH of 6.5 [20,21]. Wada et al., showed that the acylase I from Pig Kidney had an optimal pH for the reaction of around 7 and 7.5 [29].

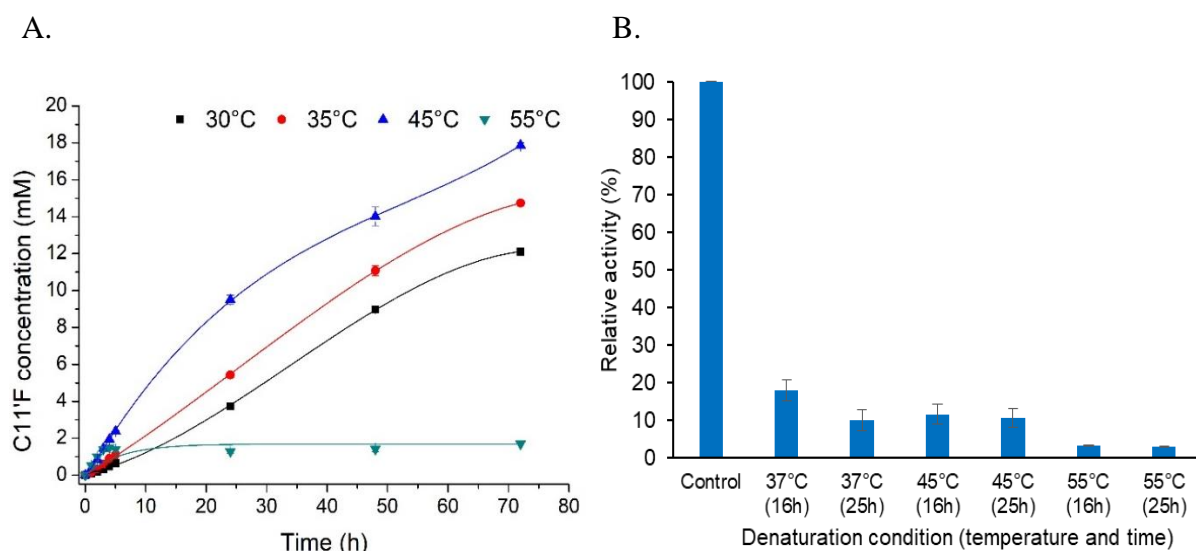


**Fig.3:** Influence of the pH on the enzymatic activity for the synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates, 1 g/L acylases crude extract at 45°C, pH [6 - 9.5] and 450 rpm magnetic agitation, A. effect of the pH on the initial rate. B. Kinetic evolution of the synthesized N-10-undecenoyl-phenylalaninesynthesis reaction at pH 8, 8.5 and 9 (n=2).

### 3.3. Influence of the temperature

The influence of the temperature of the reaction on the enzymatic activity is shown in fig 4.A. the best activity was obtained at 45°C while very low activity was observed at 55°C. The loss

of the activity at 55°C can be related to a low stability of the enzymes due to a fast protein denaturation. In order to evaluate the thermal stability of the enzymes, the aminoacylases were incubated at different temperature (37, 45 and 55°C) during 16 and 25 h before starting the reaction at 45°C. As shown in fig.4.B, the enzymes lost around 80 % of the activity after 16 h incubation at 45°C and around 90 % after 25 h and the higher is the incubation temperature, the higher is the loss of activity. The results at 55°C confirmed that the low activity observed when performing the reaction at this temperature was due to protein denaturation. Similar results were obtained by Koreishi, who studied the stability of the aminoacylase (SmAA) from *Streptomyces mobaraensis* by performing the hydrolysis of N-acetyl-L-methionine at 37 °C in Tris-HCl buffer at pH 7.5. They also showed that the enzymes lost almost all the activity after only one-hour incubation at 55°C [21].



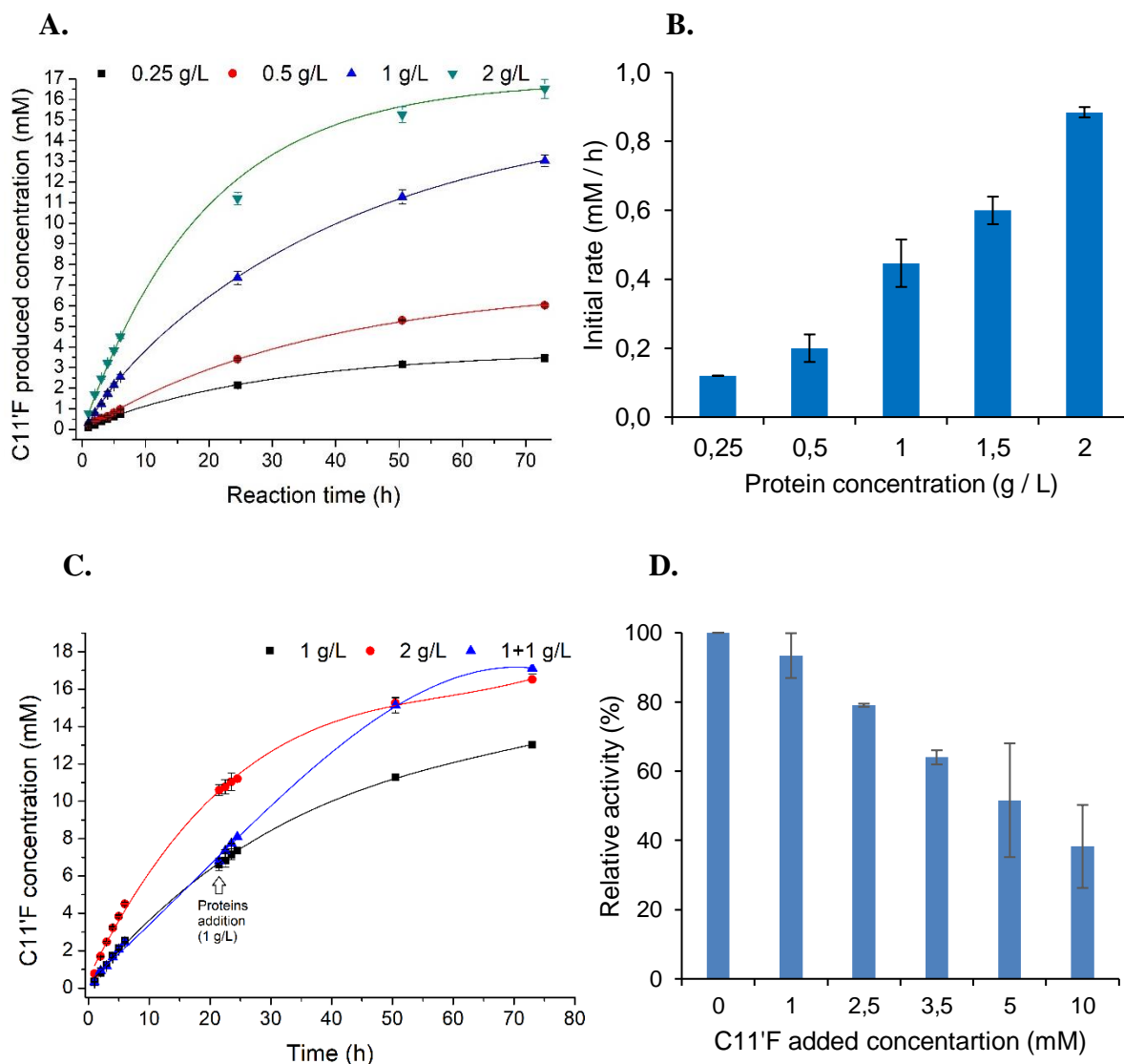
**Fig.4:** Effect of the temperature on the enzymatic activity A. Influence of the reaction temperature on the enzymatic activity for the synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates, 1 g/L acylases at T°C [30-55°C], pH 8 and 500 rpm magnetic agitation B. Thermal stability of the enzymes after 16 and 25 h incubation time at 37, 45 and 55°C compared to fresh enzymes reaction conducted in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates, 1 g/L acylases at 45°C, pH 8 and 500 rpm magnetic agitation (n=2).

### 3.4. Influence of protein concentration

Reactions using different protein concentration in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates at 45°C, pH 8 and 450 rpm magnetic agitation were conducted. By following the kinetics of the production of C11'F at the different protein



concentrations, the increase of the quantity produced after 3 days was proportional to the protein concentration when a concentration between 0.25 and 1 g/L was used. However, the increase of the produced concentration was much less important from 1 to 2 g/L while the initial rate was proportional to the quantity of protein used (Fig.5 A and B). In all cases, a decrease of the activity after a certain time was observed. This can be attributed to a relatively low thermal stability of the enzymes or to an inhibition by the product of the reaction knowing that the C11'F is soluble in the operational condition. In order to face the problem of thermal denaturation and to increase the amount of C11'F produced, a reaction was performed using 1 g/L of protein with an additional 1 g/L introduced to the reaction medium after 24 h. The kinetic of the reaction was compared to the ones with 1 and 2 g/L (Fig.5 C). The addition of enzymes during the reaction caused an increase of the production to reach the same concentration as with 2 g/L protein concentration. This means that the protein denaturation is not the only factor controlling the reaction. The second reason could then be the enzymes inhibition by the C11'F itself or that the thermodynamic equilibrium of the reaction was reached. The product inhibition of the reaction was evaluated by performing the reaction in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates and [0-10 mM] of C11'F at 45°C, pH 8 and 450 rpm magnetic agitation. The results (Fig.5 D) showed a clear product inhibition where a progressive decay of the initial activity of the enzymes was observed by increasing the concentration of the product.



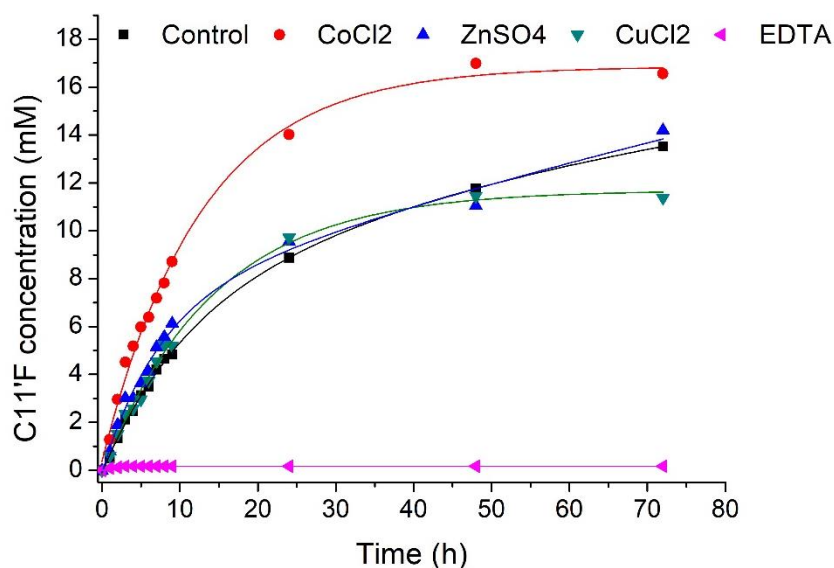
**Fig.5:** Influence of the protein concentration and the product concentration on the enzymatic activity for the synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates, 1 g/L acylases (except for the protein concentration influence) at 45°C, pH 8 and 450 rpm magnetic agitation, A. C11'F production kinetic at different enzymes concentration [0.25-2 g/L] B. Initial rate of the production at different protein concentration C. C11'F production kinetic with enzymes addition during the reaction compared to the reaction performed using 1 and 2 g/L initial enzymes concentration D. Influence of the C11'F added concentration on the initial rate of the reaction (n=2 for Fig. 5A, 5B, 5C, 5D).

### 3.5. Influence of metal activator on the reaction

As described by Dettori et al., 2018, the sequence coding the aminoacylase from *S. ambofaciens*, named SamAA, is very close to the one coding the aminoacylase from *S.*

*mobarraensis* (Sm-AA) described by Koreishi et al. in 2009 with 86 % sequence identity. This enzyme was described as belonging to a metal-dependant family which can be influenced by the addition of metal ions playing a key role in the catalytic process. To date and according to the Brenda database, only 3 aminoacylases structures have been elucidated: PDB 1Q7L from *Homo sapiens* (heterodimer of 65.11 kDa) described by Lindner et al. in 2003 [30], PDB 1YSJ from *Bacillus subtilis* (homodimer of 89.92 kDa) described by Minasov et al. in 2005 [31], PDB and PDB 4EWT from *Staphylococcus aureus* (homotetramer of 174.18 kDa) described by Girish et al. in 2013 [32]. All of them were found to be  $Zn^{2+}$ -dependent metalloenzymes. In the case of the human aminoacylase-1 from the M20 family (heterodimer), Lindner et al. identified two types of domains: a  $Zn^{2+}$  binding domain and second domain that facilitate dimerization of Zinc binding domains. They suggested that this was that dimerization that allows catalysis to occur, since aminoacylase's active site lies between its two Zinc binding domains. Regarding the catalytic hydrolytic mechanism, and through probing of the acyl-binding pocket of the same aminoacylase, Lindner et al. [33] proposed that the Zinc ions inside of aminoacylase are each coordinated to glutamate, histidine, aspartate, and water. The Zinc ion polarizes the water, facilitating its deprotonation by a nearby basic residue. The negatively charged hydroxide ion is nucleophilic and attacks the electrophilic carbonyl carbon of the substrate's acyl group. But the exact mechanism after this step is unknown. One possibility is that the carbonyl then reforms, breaks the amide bond, and forms the two products. At some point in the mechanism, another water molecule enters and coordinates with Zinc, returning the enzyme to its original state. The nucleophilic attack by water is considered as the rate-limiting step of aminoacylase's catalytic mechanism. In our case, SamAA is not multimeric but monomeric and was also shown to be  $Zn^{2+}$  dependent in hydrolysis (or synthesis) reactions in water. Without crystallographic structure so far, no mechanism can be proposed for this specific aminoacylase. Since, in this study, the production of Sam AA was performed without metal addition (no Zinc in the culture medium) we evaluated the effect of metal ions on the activity of this enzyme by using  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  cations, which were described as the most influencing ones [10,11,20,21]. Ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) was used as chelating agent to check the metal-dependency of the enzyme. As shown in Fig.6, for the same concentration of the three metal ions (0.1 mM), Cobalt ion led to a three time increase of the initial rate unlike  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  ions allowing only a slight increase. No reaction was registered when EDTA was added, which confirmed that the aminoacylases involved in the N-acylation are metalloenzymes. However, by comparing the reaction course, the thermodynamic equilibrium was reached with  $CoCl_2$  after 48h while the thermodynamic equilibrium of the control reaction and the reaction with  $Zn^{2+}$  as

metal ion was not yet reached after 72 h. For the reaction with  $\text{Cu}^{2+}$  the thermodynamic equilibrium was also reached after 48 h but with around 25% less activity than with  $\text{Co}^{2+}$  as metal ion. The influence of Cobalt concentration was therefore also investigated. The increase of the Cobalt concentration allowed an important increase of the initial rate of the reaction to reach around eleven-fold increase of the initial rate by using 0.5 mM of  $\text{CoCl}_2$  (Tab.1). When concentration from 0.3 to 0.5 mM of  $\text{CoCl}_2$  was used, the thermodynamic equilibrium was reached after only 24 h reaction time but the final product concentration was affected. Indeed, the increase of the  $\text{CoCl}_2$  concentration led to an increase in the conversion rate until 0.3 mM  $\text{CoCl}_2$  with more than 20 mM C11'F concentration. A 16 mM C11'F concentration was reached when using a 0.5 mM  $\text{CoCl}_2$  concentration. Koreishi et al. 2005 studied the influence of metal ions on the hydrolytic activity of *S. mobaraensis* aminoacylase. Their results were similar to the ones observed in this study where three-fold increase of the activity by adding 0.1 mM  $\text{CoCl}_2$  and only a slight increase by adding  $\text{Zn}^{2+}$  ion was observed. However, they showed a decrease of 80 % of the activity by adding  $\text{Cu}^{2+}$  ion (Koreishi et al., 2005a), which was not the case with the acylases from *S. ambofaciens*.



**Fig.6:** influence of different metal ions at 0.1 mM concentration on the enzymatic activity for the synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates, 1 g/L acylases at 45°C, pH 8 and 500 rpm magnetic agitation.

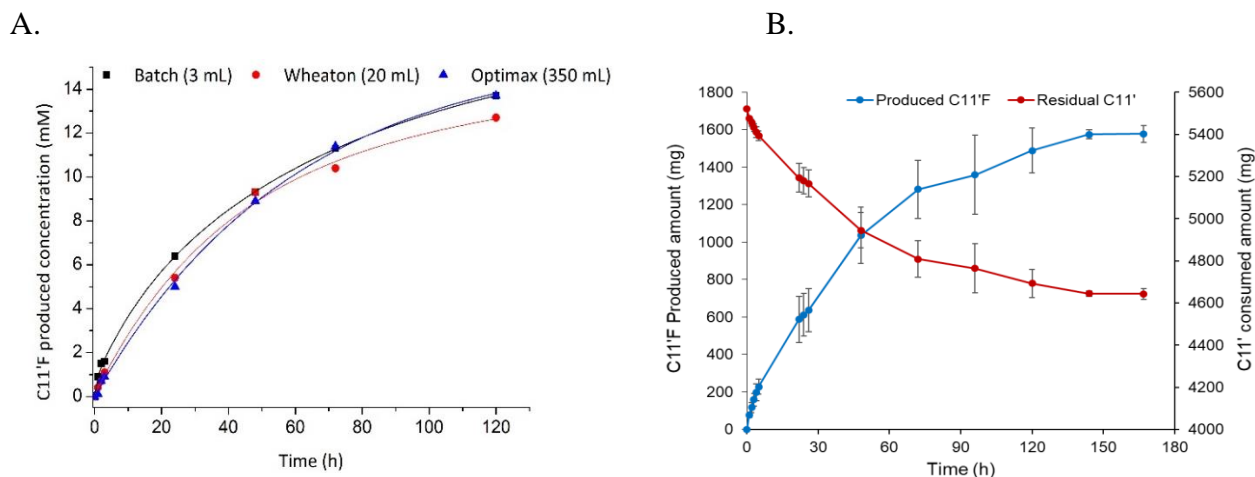
**Tab.1** effect of metal ion and the concentration of CoCl<sub>2</sub> on the initial rate of the reaction synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalaninein and the C11'F produced concentration after 48h in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates, 1 g/L acylases at 45°C, pH 8 and 500 rpm magnetic agitation.

Metal ion	No metal ions	ZnSO <sub>4</sub>	CuCl <sub>2</sub>	CoCl <sub>2</sub>	CoCl <sub>2</sub>				
Concentration (mM)		0.1	0.1	0.1	0.05	0.2	0.3	0.4	0.5
Initial rate (mM / h)	0.4 ± 0.08	0.73 ±	0.61 ±	<b>1.01 ±</b>	0.69 ±	1.64 ±	2.48 ±	3.22 ±	<b>4.34 ±</b>
		0.17	0.05	<b>0.26</b>	0.18	0.1	0.7	0.6	<b>0.4</b>
C11'F concentration (mM)	11.8 ± 1.5	12.1 ± 3	11.5 ±	<b>17 ± 1.2</b>	15.7 ±	17.7 ±	<b>22 ±</b>	20 ±	17.2 ±
			2.2		1.5	2.5	<b>0.35</b>	2.9	2.7

### 3.6. Influence of reactor configuration

In a perspective of process intensification and to evaluate the best way to produce the C11'F at gram scale, different reactor configurations were evaluated. CoCl<sub>2</sub> was not added in this part in order to avoid residual Co<sup>2+</sup> in the final product. Intensified designed reactors were used by different authors for enzymatic intensification allowing an enhancement of the product yield per space and time units [34,35]. In this kind of reactors free or immobilized enzymes can be used. The immobilization of the aminoacylases from *S. ambofaciens* was previously investigated on carriers such as mesoporous silica materials (SBA-15) using adsorption or covalent binding. However, the aminoacylases lost almost all of their activity whatever the immobilization technic used, thus showing that further studies are required in this field [36].

Different batch reactor configurations with different volume and agitation module were evaluated in order to reach a gram scale of pure enzymatic C11'F. As shown in fig.7 A, there is no influence of the reactor configuration on the final product concentration when performing the reaction in the same conditions. Indeed, the same final concentration was obtained when passing from 3 mL batch reactor with magnetic stirrer to the 300 mL batch reactor (Optimax) equipped with Rushton mechanical stirrer. The reaction using Optimax reactor was carried out seven days allowing to reach around 1.58 g of produced C11'F with around 4.6 g residual fatty acid (Fig.7 B). The final reaction mixture was used for the purification procedure in order to obtain the pure product.



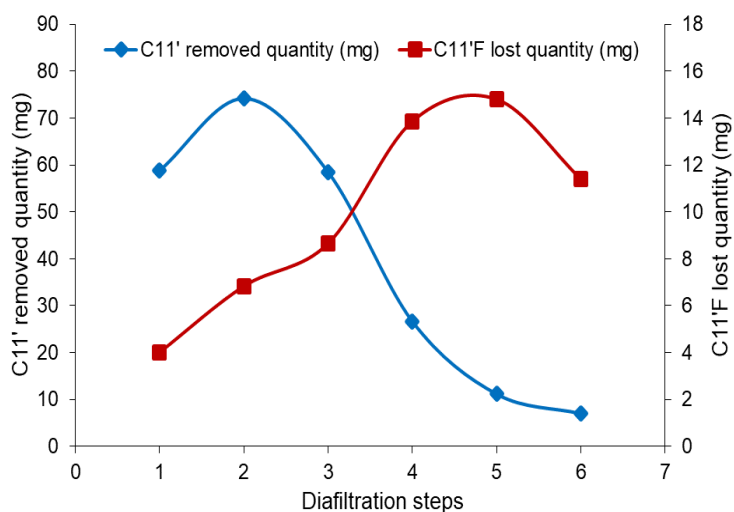
**Fig.7:** scaling-up of the C11'F synthesis reaction in 25 mM Tris-HCl buffer, NaCl 50 mM containing 100 mM of both substrates, 1 g/L acylases at 45°C, pH 8 and 500 rpm magnetic agitation A. influence of batch reactor configuration B. kinetic of the C11'F production and the C11' consumption for the reaction performed in OptiMax reactor (n=2).

### 3.7. Purification of the reaction product

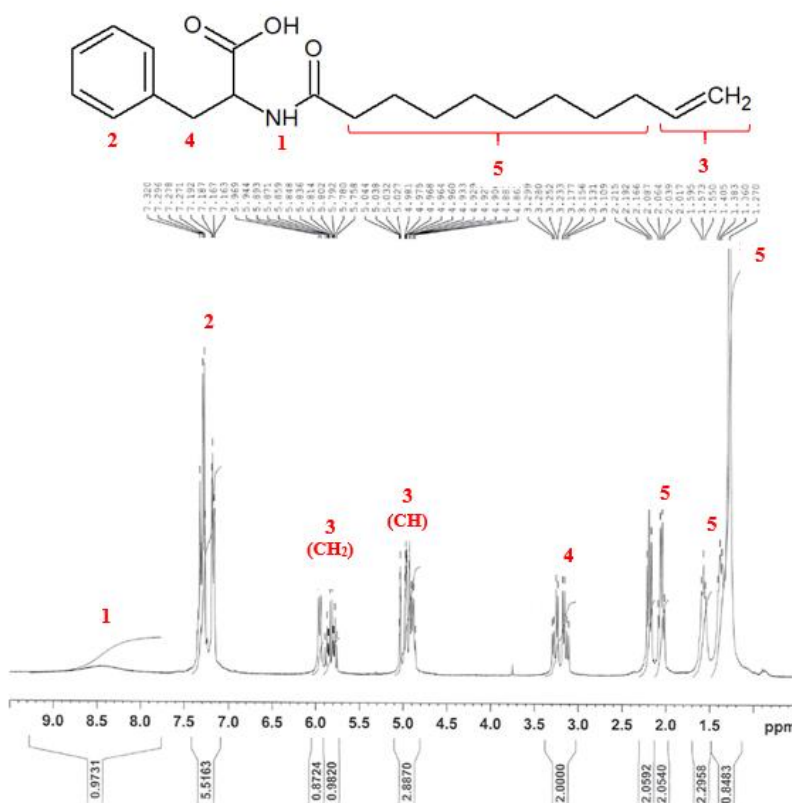
As detailed in the Materials and Methods section, the C11'F was purified using filtration and chromatographic methods. The first step consisting in an ultrafiltration on a 10 kDa allowed the selective passage of the product of interest and the residual fatty acid (331 Da and 184 Da respectively) while eliminating few impurities. As shown in fig.8 A, the three first steps of diafiltration allowed the elimination of 64 % of the fatty acid with only 15 % loss of the product from a sample of the initial reaction medium composed of 300 mg of C11' and 127 mg of C11'F. However, when more diafiltration steps were performed a higher loss of the C11'F was observed (fig.8.A). This partial separation of the C11' and the C11'F can be due to the amphiphilic property of the acylated amino-acid which can interact with the proteins standing in the retentate forming a polarization layer, while the apolar characteristic and the high quantity of the residual C11' increased its elimination in the permeate. However, after the elimination of around 64 % of the fatty acid, the membrane pores became more accessible for the C11'F, leading to a loss of the product. A compromise that allowed the partial elimination of the residual C11' while limiting the loss of the C11'F was found by applying two diafiltration steps and a concentration step. This led to the recovery of a solution containing around 1.1 g of the product and equivalent quantity of the fatty acid in addition to the aminoacylases used. The proteins were eliminated by precipitation with methanol, and the product was separated from the residual fatty acid by size exclusion chromatography. After lyophilisation 0.8 g of a 99 %

pure white powder of enzymatically produced N-10-undecenoyl-phenylalanine was obtained, as determined by mass spectroscopy and proton NMR analysis (Fig.8 B).

A.



B.



**Fig.8:** Details on C11'F purification process A. quantity of fatty acid and product removed at different diafiltration steps using a 10 kDa cut-off membrane and an initial solution of 25 mL of the final reaction mixture (300 mg of C11' and 127 mg of C11'F) B. proton NMR of the final purified product.

### **3.8. Evaluation of the biological activity of the purified product**

N-10-undecenoyl-phenylalanine was described in the literature as having a lightening effect on the skin. This activity is due to an inhibition of the production of melanin by melanocytes as antagonist to alpha-melanocyte stimulating hormone (MSH) receptor [5]. The enzymatic and the chemical N-10-undecenoyl-phenylalanine solutions were prepared in ethanol and culture medium at different concentrations (10 and 50  $\mu\text{g/mL}$ ) for the bioactivity evaluation. As represented in Tab.2, inhibitory activity at 50  $\mu\text{g/mL}$  was higher with enzymatic C11'F than with the chemical one when it was solubilized in ethanol, while it was less active when it was solubilized in the medium. This can be explained by the solubility of the enzymatic C11'F (data not shown), which was slightly lower than the chemical one in the medium. The lower solubility of the enzymatic product in the medium might be due to the presence of silica particles traces from the last chromatographic step or acetic acid used to recover the product from the column. The acetic acid can influence the ionization of the product resulting in a precipitation of a part of the product in unbuffered medium. By comparing cells viability in those conditions, the enzymatic product prepared in medium showed less toxicity than the chemical one unlike the enzymatic product prepared in ethanol, which showed higher toxicity as compared to the chemical one. Knowing that ethanol and the medium do not show any effect on the cell growth, this effect is related to the presence of the product. This can also be explained by the slight solubility difference of the enzymatic and chemical C11'F. In ethanol, enzymatic C11'F showed higher cell toxicity than the chemical one but much better lightening activity due to its good solubility. In the medium, the enzymatically produced C11'F showed lower cell toxicity than the chemical one, which might be related to the lower solubility reducing the accessibility of the product to the cells and to the MSH receptor resulting in less toxicity and activity. At 10  $\mu\text{g/mL}$ , according to statistical analysis, non-significant difference was observed between enzymatic and chemical C11'F prepared in ethanol and culture medium for the depigmentation activity, due to low concentration. However, cell toxicity was slightly more pronounced with enzymatic C11'F for no explained reason. Further study is needed in order to explain the reason of the observed differences.



**Tab.2** melanin production inhibition and cells viability evaluation.

Dilution solution	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Depigmentation* (%)		p-value T test	Cells viability** (%)		p-value T test
		Chemical C11'F	Enzymatic C11'F		Chemical C11'F	Enzymatic C11'F	
Ethanol	50	9	<b>26</b>	0.0002 (***)	<b>84</b>	75	0.0001 (***)
	10	6	9	0.2101 (NS)	<b>98</b>	95	0.0100 (*)
Culture medium	50	<b>67</b>	48	0.0463 (*)	76	<b>82</b>	0.0018 (**)
	10	17	13	0.2514 (NS)	<b>100</b>	97	0.0205 (*)

LS: limit of significance;  $0.05 < p < 0.1$ ;  $*0.01 < p < 0.05$ ;  $**0.001 < p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ , n = 6.

\*: 97% inhibition of melanin production by melanocytes using Kojic acid as positive control without any cell toxicity

\*\* : 100% cell viability correspond to the result with the control culture of melanocyte (without any added molecules)

## Conclusion

The aim of this study was to evaluate the operational conditions influencing the performances of the aminoacylases from *S. ambofaciens* for the N-acylation of the L-phenylalanine with 10-undecenoic acid as acyl donor. The results showed a positive effect of the phenylalanine concentration on the aminoacylases activity, unlike what was observed with the 10-undecenoic acid. Investigations on operational conditions showed a good N-acylation activity at 45°C, pH [7-8] but low temperature stability. The inhibitory effect of the product on the conversion rate was also demonstrated showing the interest of immobilization aiming to use these aminoacylases in continuous flow reactors. The influence of the metal ions was also studied confirming that the aminoacylases used are metallo-dependant and showing a very interesting acceleration of the reaction by adding  $\text{CoCl}_2$ . Different reactor configurations were evaluated but the batch reactor was the most suitable for the synthesis of N-10-undecenoyl-phenylalanine without any effect of the agitation mode. A purification procedure was developed leading to 0.8 g of N-10-undecenoyl-phenylalanine with more than 99% purity, under the form of a white powder. The biological activity of the product was tested on melanocyte cell cultures and showed a clear inhibition of the melanin production. When significant, the difference in the lightening activity and/or the cell toxicity observed between the C11'F of chemical origin or that issued from the enzymatic process was likely to be due to different impurities remaining in the two products. These results represent a step forward towards the development of a green

bioprocess using *S. ambofaciens* aminoacylases in aqueous media, which could constitute a promising alternative to existing chemical processes for the production and the purification of lipoaminoacids (i.e. AAS) as biosurfactants.

### **CRedit author statement**

**Mohamed Chafik Bourkaib:** Conceptualization, Investigation, Writing-Original Draft  
**Stephane Delaunay:** Conceptualization, Methodology **Xavier Framboisier:** Resources, Investigation **Catherine Humeau:** Investigation, Methodology, Writing - Review & Editing.  
**Jerôme Guilbot:** Funding Acquisition, Validation **Cecile Bize:** Ressources, Investigation, Formal analysis, Writing - Review & Editing **Estelle Illoud:** Project administration, Writing - Review & Editing **Isabelle Chevalot:** Project Administration, Supervision, Writing - Review & Editing, Validation **Yann Guiavarc'h:** Funding Acquisition, Project Administration, Supervision, Formal Analysis, Writing - Review & Editing, Validation.

### **Acknowledgement**

This work was mainly supported by the French National Research Agency (ANR) through the “ISEAPIM3” project (ANR-15-CE07-0023-01), and partly by the “Impact biomolecules” project of the « Lorraine Université d'Excellence (LUE) » (PIA-ANR). We also thank Emilien GIROT from LRGP for giving us access to the Optimax reactor and for his valuable advices.

### **References**

- [1] C. Rondel, I. Alric, Z. Mouloungui, J.-F. Blanco, F. Silvestre, Synthesis and Properties of Lipoamino Acid-Fatty Acid Mixtures: Influence of the Amphiphilic Structure, *J. Surfactants Deterg.* 12 (2009) 269–275. <https://doi.org/10.1007/s11743-009-1121-y>.
- [2] D.B. Tripathy, A. Mishra, J. Clark, T. Farmer, Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review, *Comptes Rendus Chim.* 21 (2018) 112–130. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2017.11.005>.
- [3] D. Yea, S. Lee, S. Jo, H. Yu, J. Lim, Preparation of Environmentally Friendly Amino Acid-Based Anionic Surfactants and Characterization of Their Interfacial Properties for Detergent Products Formulation, *J. Surfactants Deterg.* 21 (2018) 541–552. <https://doi.org/10.1002/jsde.12051>.
- [4] M. Sreenu, R.B.N. Prasad, P. Sujitha, C.G. Kumar, Synthesis and Surface-Active Properties of Sodium N-Acylphenylalanines and Their Cytotoxicity, *Ind. Eng. Chem. Res.* 54 (2015) 2090–2098. <https://doi.org/10.1021/ie503764v>.
- [5] D.L. Bissett, L.R. Robinson, P.S. Raleigh, K. Miyamoto, T. Hakozaki, J. Li, G.R. Kelm, Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation by topical N-undecyl-10-enoyl-L-phenylalanine and its combination with niacinamide, *J. Cosmet. Dermatol.* 8 (2009) 260–266. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2009.00470.x>.
- [6] M.C. Bourkaib, H. Randriamalala, L. Dettori, C. Humeau, S. Delaunay, I. Chevalot, Y. Guiavarc'h, Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical

- carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations, *Process Biochem.* 71 (2018) 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.008>.
- [7] R.A. Sheldon, J.M. Woodley, Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.
- [8] D. Montet, F. Servat, M. Pina, J. Graille, P. Galzy, A. Arnaud, H. Ledon, L. Marcou, Enzymatic synthesis of N- $\epsilon$ -acyllysines, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67 (1990) 771–774. <https://doi.org/10.1007/BF02540489>.
- [9] E.L. Soo, A.B. Salleh, M. Basri, R.N. Zaliha Raja Abdul Rahman, K. Kamaruddin, Optimization of the enzyme-catalyzed synthesis of amino acid-based surfactants from palm oil fractions, *J. Biosci. Bioeng.* 95 (2003) 361–367. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80068-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80068-3).
- [10] M. Koreishi, R. Kawasaki, H. Imanaka, K. Imamura, K. Nakanishi, A novel  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of N $\epsilon$ -acyl-L-lysines, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (2005b) 631–637. <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1121-2>.
- [11] M. Koreishi, D. Zhang, H. Imanaka, K. Imamura, S. Adachi, R. Matsuno, K. Nakanishi, A Novel Acylase from *Streptomyces mobaraensis* that Efficiently Catalyzes Hydrolysis/Synthesis of Capsaicins as Well as N-Acyl-L-amino Acids and N-Acyl-peptides, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 72–78. <https://doi.org/10.1021/jf052102k>.
- [12] M. Koreishi, R. Kawasaki, H. Imanaka, K. Imamura, Y. Takakura, K. Nakanishi, Efficient N $\epsilon$ -lauroyl-L-lysine production by recombinant  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis*, *J. Biotechnol.* 141 (2009a) 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.03.008>.
- [13] L. Dettori, F. Ferrari, X. Framboisier, C. Paris, Y. Guiavarc'h, L. Hôtel, A. Aymes, P. Leblond, C. Humeau, R. Kapel, I. Chevalot, B. Aigle, S. Delaunay, An aminoacylase activity from *Streptomyces ambofaciens* catalyzes the acylation of lysine on  $\alpha$ -position and peptides on N-terminal position, *Eng. Life Sci.* 18 (2017) 589–599. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700173>.
- [14] C. Bernal, F. Guzman, A. Illanes, L. Wilson, Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts, *Food Chem.* 239 (2018) 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.105>.
- [15] Y. Takakura, Y. Asano, Purification, characterization, and gene cloning of a novel aminoacylase from *Burkholderia* sp. strain LP5\_18B that efficiently catalyzes the synthesis of N-lauroyl-L-amino acids, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83 (2019) 1964–1973. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1630255>.
- [16] P. Villeneuve, Lipases in lipophilization reactions, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 515–536. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.06.001>.
- [17] R. Valivety, P. Jauregi, I. Gill, E. Vulfson, Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 879–886. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0232-8>.
- [18] A. Ferjancic-Biagini, T. Giardina, M. Reynier, A. Puigserver, Hog Kidney and Intestine Aminoacylase-Catalyzed Acylation of L-Methionine in Aqueous Media, *Biocatal. Biotransformation.* 15 (1997) 313–323. <https://doi.org/10.3109/10242429709003197>.
- [19] S.R. Morcelle, C.S. Liggieri, M.A. Bruno, N. Priolo, P. Clapés, Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57 (2009) 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.013>.

- [20] M. Koreishi, F. Asayama, H. Imanaka, K. Imamura, M. Kadota, T. Tsuno, K. Nakanishi, Purification and Characterization of a Novel Aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005a) 1914–1922. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1914>.
- [21] M. Koreishi, Y. Nakatani, M. Ooi, H. Imanaka, K. Imamura, K. Nakanishi, Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of a New Aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis* That Can Hydrolyze N-(Middle/Long)-chain-fatty-acyl-L-amino Acids as Well as N-Short-chain-acyl-L-amino acids, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009b) 1940–1947. <https://doi.org/10.1271/bbb.90081>.
- [22] D. Zhang, M. Koreishi, H. Imanaka, K. Imamura, K. Nakanishi, Cloning and characterization of penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*, *J. Biotechnol.* 128 (2007) 788–800. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.017>.
- [23] M.C. Bourkaib, S. Delaunay, X. Framboisier, L. Hôtel, B. Aigle, C. Humeau, Y. Guiavarc'h, I. Chevalot, N-acylation of L-amino acids in aqueous media: Evaluation of the catalytic performances of *Streptomyces ambofaciens* aminoacylases, *Enzyme Microb. Technol.* 137 (2020) 109536. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109536>.
- [24] S. Chung, G.J. Lim, J.Y. Lee, Quantitative analysis of melanin content in a three-dimensional melanoma cell culture, *Sci. Rep.* 9 (2019) 780. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37055-y>.
- [25] W.-L. Gao, N. Li, M.-H. Zong, Highly regioselective synthesis of undecylenic acid esters of purine nucleosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B, *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 2233. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0685-6>.
- [26] D. Shi, Y. Zhao, H. Yan, H. Fu, Y. Shen, G. Lu, H. Mei, Y. Qiu, D. Li, W. Liu, Antifungal effects of undecylenic acid on the biofilm formation of *Candida albicans*, *Int J. Clin. Pharmacol. Ther.* 54 (2016) 343–353. <https://doi.org/10.5414/CP202460>.
- [27] E. Lee, J.-E. Eom, H.-L. Kim, D.-H. Kang, K.-Y. Jun, D.S. Jung, Y. Kwon, Neuroprotective effect of undecylenic acid extracted from *Ricinus communis* L. through inhibition of  $\mu$ -calpain, *Eur. J. Pharm. Sci.* 46 (2012) 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.015>.
- [28] J.M. Walker, The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation, in: J.M. Walker (Ed.), *Protein Protoc. Handb.*, Humana Press, Totowa, NJ, 2009: pp. 11–15. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_3).
- [29] E. Wada, M. Handa, K. Imamura, T. Sakiyama, S. Adachi, R. Matsuno, K. Nakanishi, Enzymatic synthesis of N-acyl-L-amino acids in a glycerol-water system using acylase I from pig kidney, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (2002) 41–46. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0432-7>.
- [30] H.A. Lindner, V.V. Lunin, A. Alain, R. Hecker, M. Cygler, R. Ménard, Essential Roles of Zinc Ligation and Enzyme Dimerization for Catalysis in the Aminoacylase-1/M20 Family, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 44496–44504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304233200>.
- [31] G. Minasov, L. Shuvalova, J.S. Brunzelle, F.R. Collart, W.F. Anderson, Crystal Structure of *Bacillus Subtilis* YXEP Protein (APC1829), a Dinuclear Metal Binding Peptidase from M20 Family. 2005. <https://doi.org/10.2210/pdb1ysj/pdb>.
- [32] T.S. Girish, V.B. Melwin Colaco, S. Misquith, B. Gopal, Structure of an amidohydrolase, SACOL0085, from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* COL. *Acta Crystallogr. F.* 69 (2013) 103–108. <https://doi.org/10.1107/S1744309112049822>

- [33] H.A. Lindner, A. Alary, M. Wilke, T. Sulea, Probing the acyl-binding pocket of aminoacylase-1, *Biochemistry* 47 (2008) 4266–4275. <https://doi.org/10.1021/bi702156h>.
- [34] J.M. Bolivar, J. Wiesbauer, B. Nidetzky, Biotransformations in microstructured reactors: more than flowing with the stream?, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.005>.
- [35] M.P.C. Marques, P. Fernandes, Microfluidic Devices: Useful Tools for Bioprocess Intensification, *Molecules.* 16 (2011) 8368–8401. <https://doi.org/10.3390/molecules16108368>.

### 6.3 Contribution de l'article

L'objectif de cette étude concernait l'investigation des conditions réactionnelles influençant les performances catalytiques des aminoacylases de *S. ambofaciens* en milieu aqueux et la purification du produit de la réaction afin d'évaluer son activité biologique. La réaction de synthèse du N-10-undecenoyl-phenylalanine par l'acylation enzymatique de la phénylalanine avec de l'acide 10-undécénoïque a été utilisée comme modèle en raison des propriétés biologiques de ce bio-tensioactif et de son intérêt industriel. L'influence des conditions opératoires sur les performances catalytiques des aminoacylases de *S. ambofaciens* a été étudiée en milieu aqueux (tampon Tris-HCl), en mode discontinu, dans un réacteur agité. L'évaluation de l'influence des substrats sur la réaction de synthèse a montré un effet positif de l'augmentation de la concentration en phénylalanine contrairement à la concentration en acide gras qui n'a que peu d'impact sur le taux de conversion. Une concentration équimolaire (0,1 M / 0,1 M) des deux substrats a été utilisée pour la suite de l'étude. Les aminoacylases de *S. ambofaciens* ont présenté une activité catalytique maximale à une température de 45°C. Par contre, ces enzymes ont montré une faible stabilité thermique suite à une incubation à 37, 45 ou 50°C. Les vitesses initiales de réaction les plus élevées ont été obtenues pour des pH de 8,5 - 9. Cependant, un pH de 8 du milieu réactionnel a été retenu comme le meilleur compromis étant donnée la faible stabilité au cours du temps des enzymes observée lors des réactions réalisées à des pH supérieurs à 8. Par ailleurs, un effet inhibiteur du produit de la réaction, le N-10-undecenoyl-phenylalanine (C11'F), a été démontré par l'ajout de concentrations croissantes en produit au début de la réaction. Enfin, les résultats en présence d'ions métalliques ont été similaires à ceux obtenus lors des réactions de synthèse de l' $\alpha$ -lauroyl-lysine (chapitre 4). Cela a permis de démontrer notamment un effet activateur du cobalt sur la réaction de synthèse se traduisant par une augmentation importante de la vitesse initiale et du taux de conversion. Par ailleurs, l'amélioration de l'activité enzymatique par ajout du cobalt dépend fortement de la concentration de ce dernier. En effet, les meilleures performances ont été obtenues avec une concentration de 0,3 mM de CoCl<sub>2</sub>, mais au-delà de cette concentration, un effet inhibiteur de ce métal a été observé. Le changement de système réactionnel (volume et configuration du réacteur) n'a eu aucun effet sur les performances des enzymes. Les mélanges réactionnels issus de la réaction de synthèse du C11'F réalisée dans un réacteur de 1 L (300 mL de mélange final) ont été utilisés pour l'extraction et la purification du C11'F, suivant la démarche présentée en figure 6.1. Le produit final a présenté une pureté de plus de 99%, évaluée par LC-MS-MS et par RMN. L'activité inhibitrice de ce produit sur la synthèse de mélanine

par les mélanocytes a été déterminée et les tests biologiques réalisés sur des cultures de cellules mélanocytes ont confirmé la présence d'activités éclaircissantes de la peau comparable à celles obtenues avec du C11'F produit par voie chimique. Ces résultats décrivent pour la première fois la production de C11'F par voie enzymatique mais le rendement de conversion maximale obtenu par voie enzymatique (22%) reste bien plus faible comparativement à celui obtenu par voie chimique (plus de 80%). Une extrapolation à plus grande échelle n'est pas envisageable dans l'état actuel et nécessite une étude plus approfondie et plus large par l'utilisation, par exemple, de réacteur intensifié tels que les réacteurs micro-fluidiques et/ou par le développement d'une méthode d'immobilisation efficace permettant d'améliorer l'activité et la stabilité de ces aminoacylases.

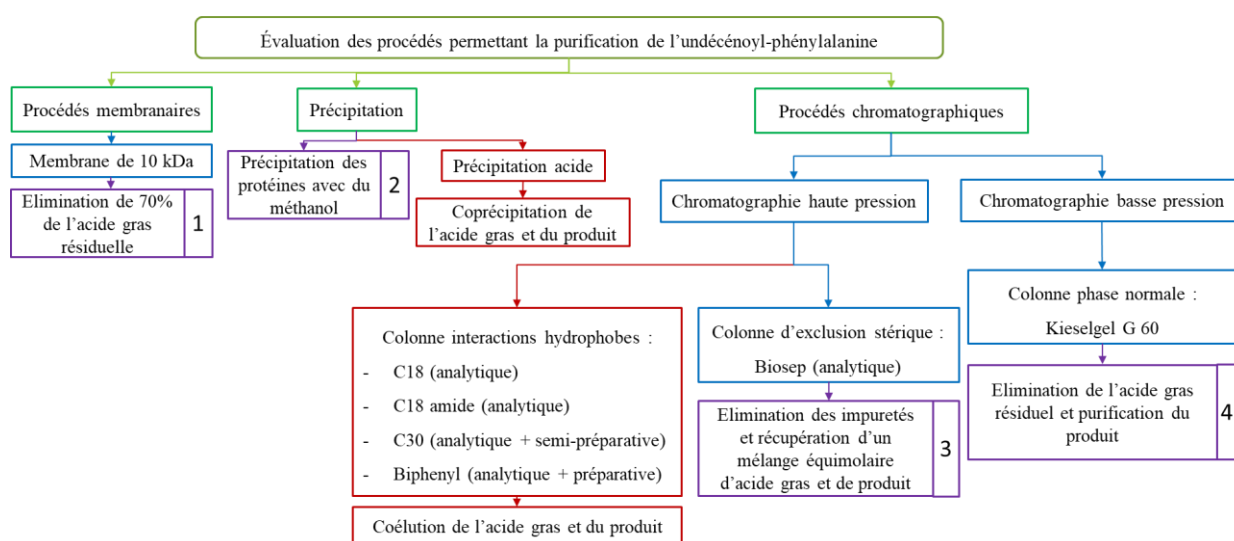


Figure 6.1 : procédures de purification évaluées et sélectionnées pour la purification du C11'F

#### 6.4 Conclusion

Suite aux résultats obtenus décrits dans les chapitres précédents, l'utilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens*, sous forme libre, en milieux aqueux, a été retenue comme le système réactionnel le plus adapté pour l'acylation enzymatique d'acides aminés. Etant donné que les conditions opératoires influençant la réaction de N-acylation des acides aminés par l'utilisation de ces aminoacylases n'avait pas été étudiée auparavant, ce chapitre a permis d'évaluer les paramètres permettant une amélioration de la synthèse enzymatique du C11'F qui présente un intérêt industriel important de par ses propriétés tensioactives et son activité éclaircissante de la peau. Il a ainsi pu être défini que les aminoacylases présentent une activité maximale à une température de 45°C, un pH 8 et en présence de à 0,3 mM de CoCl<sub>2</sub> mais avec un taux de conversion qui reste faible par rapport à la voie chimique (20% vs plus de 80%), avec une faible stabilité thermique et une inhibition de l'activité par le produit de la réaction. Cependant,

## Chapitre VI : mise en œuvre d'un procédé de production et de purification du C11'-Phe

l'extrapolation du procédé enzymatique mise en œuvre est, à ce jour, économiquement incompatible, en particulier en tenant en compte du coût de production de l'enzyme. Le produit issu de la réaction a été purifié permettant l'obtention de C11'F quasi pure sous forme de poudre blanche, présentant une activité inhibitrice de la production de mélanine par les mélanocytes. C'est la première fois qu'un procédé enzymatique permettant la synthèse d'un bio-tensioactif présentant une telle activité biologique est décrit.



## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

---



## Conclusion générale et perspectives

Le but principal de cette thèse était de développer un procédé de N-acylation enzymatique d'acides aminés pour la production de lipoaminoacides (LAA), très utilisés en industrie, afin de proposer une alternative au procédé chimique, moins respectueux de l'environnement, actuellement utilisé en industrie. Ce travail s'inscrivait dans le cadre du projet ANR ISEAPIM3 (Intensified & Sustainable Enzymatic Acylation Processes on Innovative Macroporous/Mesoporous Materials 2015-2019) qui visait également le développement de supports innovants pour l'immobilisation d'enzymes. Afin d'atteindre cet objectif, il a été nécessaire de mettre en place une démarche expérimentale afin de sélectionner le meilleur couple enzyme / solvant réactionnel permettant l'acylation d'acides aminés en utilisant des solvants dits « verts » et d'étudier les mécanismes catalytiques et la sélectivité de ces catalyseurs à l'échelle réactionnelle et moléculaire (chapitre 3 et 4), ainsi qu'à l'échelle du procédé par l'immobilisation des enzymes (chapitre 5). Le procédé le plus adapté à la production d'acide aminé acylé a été alors intensifié pour la production d'un surfactant à base d'acide aminé, à fort intérêt industriel, dont l'activité biologique a été comparée au produit issu de la voie chimique industrielle (chapitre 6).

La première étape a consisté à évaluer et comparer les performances de la lipase B de *C. antarctica* dans différents solvants non aqueux et des aminoacylases de *S. ambofaciens* en milieu aqueux pour la réaction de N-acylation d'acides aminés avec des acides gras. Étant donné que la structure 3D de CALB est connue, il a été possible d'évaluer les interactions moléculaires mises en œuvre lors de ces réactions d'acylation.

L'évaluation des performances de CALB pour la réaction d'acylation des acides aminés, en particulier de la phénylalanine avec l'acide undécénoïque, a été réalisée en utilisant plusieurs solvants non-aqueux dont le solvant organique M<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, le CO<sub>2</sub> supercritique et les solvants eutectiques profonds (choline chloride / urée et glycérol). Les résultats ont montré de faibles performances de cette enzyme sauf dans le cas de la lysine où une acylation en position epsilon a été vérifiée. Cette faible réactivité pourrait être liée à plusieurs facteurs tels que le caractère hydrophile des acides aminés, incompatible avec l'utilisation des milieux apolaires et conduisant à la précipitation de ces derniers, ou encore, la viscosité du solvant, notamment dans le cas des solvants eutectiques, qui peut engendrer des limitations de transfert du substrat vers le site actif. Une autre raison de cette faible activité pourrait être la réactivité potentielle du solvant avec les substrats ou l'enzyme pouvant induire la formation de liaisons carbamates

## Conclusion et perspectives

inhibant l'activité enzymatique dans le cas du scCO<sub>2</sub> ou encore l'apparition de produits secondaires par interaction de l'acide aminé avec les constituants du solvant réactionnel (urée) réduisant sa disponibilité pour la réaction. L'absence d'affinité de l'enzyme pour certains des substrats étudiés peut aussi être la raison de l'absence de conversion ; c'est pourquoi, une étude à l'échelle moléculaire a été réalisée. L'étude *in silico* a débuté par une étape de dynamique moléculaire afin d'optimiser la structure de l'acyle-enzyme (C11'-CALB) puis une étape de simulation de docking rigide entre cette structure et les différents acides aminés a été réalisée puis analysée suivant des critères de distance entre les résidus catalytiques et le groupement nucléophile (groupement amine). Les résultats ont démontré une faible probabilité d'apparition d'acides aminés N- $\alpha$ -acylés sauf pour l'alanine et pour l'acide aspartique ce qui n'était pas en accord avec les résultats expérimentaux. Dans le cas de la lysine, la simulation a montré une possible acylation sur la chaîne latérale, ce qui, dans ce cas, était cohérent avec les résultats obtenus. Pour les autres acides aminés certaines poses présentaient un bon positionnement dans la cavité catalytique, mais ces dernières étaient peu favorables sur le plan énergétique. Cette faible réactivité semble s'expliquer par des interactions de type liaison hydrogène et/ou des interactions hydrophobes avec des résidus localisés à l'entrée du site actif (Ala141, Leu140, Ala141, Leu144, et Val154), stabilisant ainsi le substrat à l'entrée de la cavité, ou avec des résidus proches de la triade catalytique (Gln157 et Asp134) qui stabilisent l'acide aminé dans des positions non favorables à une N-acylation. Par ailleurs, ces résultats fournissent des premiers éléments de compréhension de la sélectivité de CALB vis-à-vis des acides aminés mais ne nous permettent pas de conclure avec certitude sur l'inadéquation de CALB à catalyser la réaction d'acylation de ce genre de composés, ce qui pourrait expliquer l'absence de références bibliographiques traitant de l'acylation d'acides aminés autres que la lysine. Afin d'étayer ces premiers résultats, une étude complémentaire *in silico* plus approfondie devra être réalisée, par exemple par le calcul d'énergie d'interactions électrostatiques. D'autres acides gras peuvent aussi être utilisés comme donneurs d'acyles à la place de l'acide undécénoïque ce qui pourra changer le comportement des acides aminés au niveau de la cavité catalytique.

Dans un deuxième système réactionnel, l'utilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* a été évaluée en milieu aqueux tamponné. Ces enzymes ont été décrites dans une étude précédente comme capables de catalyser la réaction d'acylation de certains peptides et de la lysine au niveau de leur fonction amine de la chaîne principale (Dettori et al., 2017). Par ailleurs, la spécificité de substrat de ces enzymes vis-à-vis des autres acides aminés et d'autres donneurs d'acyle n'avait jamais été établie. Ainsi, l'étude de la spécificité de substrat vis-à-vis des 20

## Conclusion et perspectives

acides aminés protéinogéniques a été réalisée en présence d'acide undécénoïque. Les aminoacylases ont présenté une spécificité assez large avec une acylation orientée exclusivement sur l'amine de la chaîne principale, en position alpha, sans produit secondaire visible par LC-MS-MS. Les meilleures performances ont été obtenues en présence de l'arginine, la lysine, la leucine et la méthionine. La sélectivité de ces enzymes envers différents donneurs d'acyles a également été établie en utilisant des acides gras de différentes longueurs de chaîne. Les résultats ont montré que l'augmentation de la longueur de la chaîne grasse, jusqu'à 12 carbones, permettait une amélioration du taux de conversion. Au-delà, une diminution de l'activité est observée. Par ailleurs, un changement de la régiosélectivité des enzymes a été observé lorsque des acides gras d'une longueur inférieure à 8 carbones sont utilisés. En effet, en présence d'acide caprylique ou d'acides gras à plus courte chaîne, de la lysine acylée en position epsilon est synthétisée. Cela peut être mis en lien avec la présence de Sam-ELA qui catalyse la réaction de N-acylation de la lysine en position epsilon. En effet, l'utilisation d'un extrait enzymatique issu d'une souche de *S. ambofaciens* pour laquelle les gènes codant pour Sam-ELA et Sam-PVA ont été délétés a montré l'absence de lysine acylée en position epsilon en présence de courtes chaînes grasses. Une étude cinétique de la réaction d'acylation de la lysine avec de l'acide laurique a aussi été réalisée afin d'évaluer l'influence de la concentration de substrat et de la présence des ions divalents sur l'activité enzymatique. Une influence positive du donneur d'acyle et négative de l'accepteur d'acyle a ainsi pu être démontrée sur la réaction de N-acylation. La comparaison de l'utilisation de différents métaux a permis de mettre en évidence l'effet activateur du cobalt sur l'activité des aminoacylases de *S. ambofaciens*. Ces résultats sont très prometteurs et nécessitent d'être élargis par une étude cinétique plus approfondie afin de mieux comprendre le mécanisme réactionnel mis en œuvre. L'étude de la spécificité de substrat et la caractérisation des différentes aminoacylases prises séparément devront être aussi réalisées soit après purification ou suite à une production hétérologue.

Des tentatives d'expression hétérologues des différentes aminoacylases dans une souche d'*E. coli* Origami B ont été menées. Différentes souches d'*E. coli* productrices des aminoacylases Sam-AA et Sam-ELA ont pu être construites et la régiosélectivité des enzymes produites a pu être confirmée en réalisant la réaction d'hydrolyse de l' $\alpha$ - et de l' $\epsilon$ -acétyl-lysine. Cependant, ces enzymes étaient synthétisées principalement sous la forme de corps d'inclusion. Cela a exclu l'utilisation de ces souches, durant la thèse, pour la production hétérologue de Sam-AA et des autres aminoacylases pures. Il sera donc nécessaire de trouver un système d'expression

## Conclusion et perspectives

plus adapté à la production de ces enzymes. La renaturation des corps d'inclusion est aussi une solution qui peut être envisagée. La production de ces acylases pures ouvrira les portes à de nombreuses études expérimentales et par modélisation moléculaire après leur cristallisation, ce qui est un objectif majeur afin d'envisager une utilisation de ces biocatalyseurs de manière intensifiée et à plus grande échelle.

A l'issue de ces résultats, l'utilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* est apparue comme la meilleure alternative pour la N-acylation des acides aminés. Cependant, les enzymes libres présentent une stabilité très faible et leur séparation du milieu réactionnel après utilisation reste très compliquée. Pour ces raisons, une immobilisation de ces dernières présente un intérêt du point de vue de la mise en œuvre des réactions. Les travaux associés à cette immobilisation ont été présentés dans le chapitre 5.

Les aminoacylases de *S. ambofaciens* ont été immobilisées sur des supports de différentes natures et présentant différentes propriétés mécaniques et physicochimiques. Des supports siliceux mésoporeux (SBA15), méso-macroporeux (MMS et SBA-si-HIPE) et macroporeux (SI-HIPE) à base de silice développés en partenariat avec le CRPP et le L2CM ont été élaborés et les aminoacylases ont été immobilisées par différentes méthodes. L'évaluation de l'activité et de la stabilité des acylases immobilisées a été mise en œuvre en milieux aqueux en réalisant la réaction d'hydrolyse de l' $\alpha$ -acétyl-lysine et/ou la réaction de synthèse de l' $\alpha$ -lauroyl-lysine.

L'augmentation de la taille des pores des supports a permis une augmentation progressive de la quantité d'enzymes immobilisée grâce à une réduction des limitations de transfert de matière vers l'intérieur des pores. L'organisation des mésopores a aussi influencé le taux d'immobilisation dans le cas des supports méso-macroporeux. Ainsi, une augmentation d'un facteur 2 de la quantité d'enzyme immobilisée a ainsi été obtenue dans les mésopores de structure hexagonale (SBA15) par rapport aux mésopores vermiformes (MMS). En termes d'activité catalytique, les aminoacylases immobilisées sur les MMS et les SBA15 ont montré de meilleures performances et stabilités par rapport aux autres supports. Cela était probablement lié à une meilleure orientation de l'enzyme à la surface de ces supports. Les deux supports sélectionnés (méso-poreux et méso-macroporeux) ont été, par la suite, fonctionnalisés avec de l'APTES à différents pourcentages, afin d'augmenter graduellement l'hydrophobie de surface et de favoriser les interactions électrostatiques. Cela a permis une augmentation de la quantité d'enzyme immobilisée jusqu'à un taux d'APTES de 10%. L'évaluation des performances catalytiques des enzymes immobilisées a montré une différence entre les deux types de

## Conclusion et perspectives

supports. Dans le cas des SBA15, l'augmentation du taux de fonctionnalisation a permis une amélioration de l'activité enzymatique ce qui n'était pas le cas des enzymes immobilisées sur les supports MMS fonctionnalisés. Ceci est principalement dû à la fragilité de la paroi des MMS ou à un effondrement de la structure mésoporeuse qui aurait bouché l'entrée des pores causant des limitations de transfert du substrat vers l'enzyme malgré sa présence en quantité plus importante. L'encapsulation des aminoacylases dans une double émulsion a aussi été réalisée mais l'enzyme immobilisée a présenté une très faible stabilité malgré l'excellente activité hydrolytique observée. De plus, l'enzyme encapsulée n'était pas en mesure de catalyser la réaction de synthèse du lauroyl-lysine, là aussi, en raison de limitations de transfert du substrat vers l'enzyme. En conclusion, les supports mésoporeux SBA15 fonctionnalisés avec de l'APTES ont présenté, par leur porosité et leur stabilité structurale, les meilleurs résultats mais l'activité enzymatique reste très faible comparée à celle des enzymes libres. Il reste donc nécessaire de réaliser d'autres études plus approfondies en utilisant d'autres types de matériaux (inorganiques ou polymériques) avec une optimisation des propriétés de surface par greffage d'autres groupements fonctionnels afin de pouvoir réaliser les réactions de synthèse en réacteur à lit fixe. Une étude *in-silico* de méso-modélisation des interactions enzyme / support pourrait s'avérer très utile afin de comprendre les interactions mises en jeu et d'orienter le choix du support et du groupement organique. Dans l'attente de la mise au point d'une procédure d'immobilisation efficace permettant le maintien de bonnes activités et stabilités de ces enzymes, l'utilisation des aminoacylases libres pour réaliser les réactions de N-acylation des acides aminés reste la meilleure alternative.

Afin d'évaluer l'intérêt des supports développés par les équipes partenaires, l'étude de l'activité et de la stabilité de CALB a été réalisée, en  $scCO_2$ , en prenant la synthèse de l'acétate de géraniol (réaction de O-acylation) comme réaction modèle étant donnée l'absence de N-acylation lors des réactions étudiées précédemment au cours de notre travail dans ce solvant, même en présence de cosolvant. Plusieurs supports et méthodes d'immobilisation ont été utilisés et l'activité et la stabilité des enzymes immobilisées ont été déterminées, en continu, dans un réacteur à lit fixe, sous  $scCO_2$ , à 55°C et 200 bars. Des supports à base de carbone (nanotubes de carbone) et de silice (SBA15 et si-HIPE) ont également été utilisés pour l'immobilisation par physisorption et/ou par chimisorption en utilisant différents agents de greffage. Les performances des biocatalyseurs produits ont été comparées à celles de CALB commerciale immobilisée sur des supports polymériques de polyméthacrylate divinylbenzène macroporeux (publication dans *Process Biochemistry* présentée en annexe 5). Les principaux

## Conclusion et perspectives

résultats ont permis de mettre en évidence que la lipase immobilisée sur les supports non poreux à base de carbone (nanotubes de carbone) présentait une meilleure activité et une meilleure stabilité lorsqu'elle était immobilisée par chimisorption. Cependant, une faible stabilité au recyclage a été observée, comparativement à la CALB immobilisée commerciale, probablement en raison des contraintes de cisaillement lors de l'étape de dépressurisation qui impactent directement les enzymes immobilisées sur la surface externe du support. L'utilisation de supports poreux pourrait réduire cet effet par l'immobilisation de l'enzyme à l'intérieur des pores. A cet effet, CALB a été immobilisée sur SBA15 en utilisant différents greffons. L'utilisation de l'isocyanate pour l'immobilisation permettait de maintenir de meilleures performances catalytiques comparativement au glutaraldéhyde et au glymo. Par ailleurs, la stabilité de l'enzyme était faible et l'activité résiduelle était très inférieure à celle de CALB commerciale. Ceci est probablement lié à des limitations diffusionnelles des substrats vers le cœur des mésopores contenant l'enzyme ou à une mauvaise orientation de l'enzyme immobilisée. Pour résoudre ce problème, l'augmentation de la taille des pores pourrait être envisagée. L'utilisation des supports macroporeux si-HIPE a également été évaluée en réalisant l'immobilisation de CALB avec différentes concentrations d'isocyanates (2,5 et 5 mmoles d'isocyanate / g de support ISO2,5 et ISO5 respectivement) afin de comparer l'effet de la concentration du greffon. Les résultats ont montré que l'enzyme immobilisée présentait des performances meilleures que celles de CALB commerciale, en particulier lors de l'immobilisation en présence de ISO2,5. Par contre, un effet inhibiteur a été mis en évidence lors d'une fonctionnalisation avec une concentration trop importante d'isocyanate. Ces résultats préliminaires en O-acylation sous  $scCO_2$  sont très prometteurs et nécessitent un approfondissement des investigations sur l'immobilisation des lipases sur ce support macroporeux afin d'évaluer l'impact d'autres greffons sur le taux d'immobilisation et de conversion.

À l'issue des travaux présentés ci-dessus, il est apparu que la mise en œuvre des aminoacylases de *S. ambofaciens* sous forme libre demeurait pour le moment l'approche la plus appropriée pour la synthèse de lipoaminoacides d'intérêt industriel en phase aqueuse. La dernière étape de cette thèse a consisté à évaluer la possible intensification de la réaction de synthèse de N-10-undecenoyl-phenylalanine (C11'F) et de mettre en place un procédé de purification de ce produit afin de comparer son activité inhibitrice de la synthèse de mélanine par les mélanocytes avec celle du produit synthétisé par voie chimique (tâche 4 du projet ANR).



## Conclusion et perspectives

L'influence des conditions de mise en œuvre du procédé sur les performances catalytiques des aminoacylases de *S. ambofaciens* a été déterminée en mode batch dans un réacteur agité. Il a été montré qu'une augmentation de la concentration en phénylalanine conduisait à un meilleur taux de conversion alors que l'augmentation de la concentration en acide undécénoïque (entre 25 et 200 mM) était très peu influente. L'effet de la température sur la réaction a montré une meilleure activité catalytique à une température de 45°C mais il faut souligner la faible stabilité thermique de ces enzymes. Par ailleurs, il a été déterminé que les aminoacylases étaient actives à des pH entre 6,5 et 9 avec une bonne activité et une meilleure stabilité au cours du temps à pH 8. Il a également pu être démontré que le produit de la réaction présentait un effet inhibiteur de l'activité enzymatique. L'ajout d'activateur métallique, en l'occurrence le cobalt, a permis une accélération très importante de la vitesse initiale de la réaction et du taux de conversion. Cependant, à partir de 0,3 mM, un effet inhibiteur du cobalt a été mis en évidence. Lors de la montée en échelle et du changement de système réactionnel (volume et configuration du réacteur), très peu de variations de la cinétique de réaction ont été mises en évidence. Enfin, à l'issue de la purification du C11'F synthétisé, par ultrafiltration sur des membranes de 10 KDa et par différents types de chromatographie, un produit présentant une pureté de plus de 99% a pu être obtenu. Les tests réalisés sur les cultures de cellules mélanocytes ont mis en évidence la présence d'une activité inhibitrice de la synthèse de mélanine par le produit obtenu. C'est la première fois que la production de C11'F par voie enzymatique est décrite. Cependant, à ce jour, le faible taux de conversion par rapport à la voie chimique (20% vs plus de 80%), la faible stabilité thermique et l'inhibition de l'activité enzymatique par le produit de la réaction présentent un frein à l'extrapolation de ce procédé à l'échelle pilote puis industrielle. De plus, le coût élevé de la production de l'enzyme rend le procédé enzymatique économiquement incompatible. Il est donc nécessaire d'approfondir et d'élargir cette étude préliminaire mais très prometteuse par l'utilisation de réacteurs intensifiés plus adaptés et bien contrôlés et par la mise en place d'une méthode d'immobilisation efficace permettant d'améliorer l'activité et la stabilité de ces aminoacylases. L'expression hétérologue de ces aminoacylases, et en particulier de SamAA, devrait également permettre de rendre le procédé de synthèse enzymatique plus compétitif. Une voie d'amélioration complémentaire serait de modifier génétiquement cette dernière enzyme afin de disposer d'un catalyseur enzymatique optimisé pour la synthèse d'acides aminés acylés dans des conditions plus respectueuses de l'environnement. Le procédé mettant en œuvre cette enzyme pourrait alors constituer une alternative de choix aux procédés chimiques actuellement utilisés industriellement.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---



## Références

- ABBOTT, A. P., CAPPER, G., DAVIES, D. L., RASHEED, R. K. et TAMBYRAJAH, V., 2003. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. In : *Chemical Communications*. 2003. n° 1, p. 70-71. DOI 10.1039/b210714g.
- ABBOTT, Andrew P., BOOTHBY, David, CAPPER, Glen, DAVIES, David L. et RASHEED, Raymond K., 2004. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. In : *Journal of the American Chemical Society*. 1 juillet 2004. Vol. 126, n° 29, p. 9142-9147. DOI 10.1021/ja048266j.
- ABREU SILVEIRA, Erick, MORENO-PEREZ, Sonia, BASSO, Alessandra, SERBAN, Simona, PESTANA MAMEDE, Rita, TARDIOLI, Paulo W., SANCHEZ FARINAS, Cristiane, ROCHA-MARTIN, Javier, FERNANDEZ-LORENTE, Gloria et GUIBAN, Jose M., 2017. Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the Ethanolysis of oil in fully anhydrous medium. In : *BMC Biotechnology*. 16 décembre 2017. Vol. 17, n° 1, p. 88. DOI 10.1186/s12896-017-0407-9.
- ABREU SILVEIRA, Erick, MORENO-PEREZ, Sonia, BASSO, Alessandra, SERBAN, Simona, PESTANA-MAMEDE, Rita, TARDIOLI, Paulo W., FARINAS, Cristiane S., CASTEJON, Natalia, FERNANDEZ-LORENTE, Gloria, ROCHA-MARTIN, Javier et GUIBAN, Jose M., 2019. Biocatalyst engineering of *Thermomyces Lanuginosus* lipase adsorbed on hydrophobic supports: Modulation of enzyme properties for ethanolysis of oil in solvent-free systems. In : *Journal of Biotechnology*. 10 janvier 2019. Vol. 289, p. 126-134. DOI 10.1016/j.jbiotec.2018.11.014.
- ACMITE MARKET INTELLIGENCE, 2016. 4th Edition : *Market Report : Global Surfactant Market* [en ligne]. S.l. Disponible à l'adresse : <https://www.acmite.com/market-reports/chemicals/global-surfactant-market.html>.
- ADACHI, Y. et LU, Bcy, 1983. Supercritical Fluid Extraction with Carbon-Dioxide and Ethylene. In : *Fluid Phase Equilibria*. 1983. Vol. 14, n° OCT, p. 147-156. DOI 10.1016/0378-3812(83)80120-4.
- AFONSO, Raquel FM Frade, Carlos AM, 2010. Impact of ionic liquids in environment and humans: An overview - Raquel FM Frade, Carlos AM Afonso, 2010. In : *Human & Experimental Toxicology* [en ligne]. 28 mai 2010. [Consulté le 22 juin 2020]. Disponible à l'adresse : <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327110371259>.
- AICHLER, Michaela, BORGMANN, Daniela, KRUMSIEK, Jan, BUCK, Achim, MACDONALD, Patrick E., FOX, Jocelyn E. Manning, LYON, James, LIGHT, Peter E., KEIPERT, Susanne, JASTROCH, Martin, FEUCHTINGER, Annette, MUELLER, Nikola S., SUN, Na, PALMER, Andrew, ALEXANDROV, Theodore, DE ANGELIS, Martin Hrabe, NESCHEN, Susanne, TSCHOP, Matthias H. et WALCH, Axel, 2017. N-acyl Taurines and Acylcarnitines Cause an Imbalance in Insulin Synthesis and Secretion Provoking beta Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes. In : *Cell Metabolism*. 6 juin 2017. Vol. 25, n° 6, p. 1334-+. DOI 10.1016/j.cmet.2017.04.012.
- ALVES, Joana S., GARCIA-GALAN, Cristina, SCHEIN, Mirela F., SILVA, Alexandre M., BARBOSA, Oveimar, AYUB, Marco A. Z., FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto et RODRIGUES, Rafael C., 2014. Combined Effects of Ultrasound and Immobilization Protocol on Butyl Acetate Synthesis Catalyzed by CALB. In : *Molecules*. juillet 2014. Vol. 19, n° 7, p. 9562-9576. DOI 10.3390/molecules19079562.

ANDREWS, Thomas, 1869. XVIII. The Bakerian Lecture.—On the continuity of the gaseous and liquid states of matter. In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1 janvier 1869. Vol. 159, p. 575-590. DOI 10.1098/rstl.1869.0021.

ANSORGE-SCHUMACHER, Marion B. et THUM, Oliver, 2013. Immobilised lipases in the cosmetics industry. In : *Chemical Society Reviews*. 8 juillet 2013. Vol. 42, n° 15, p. 6475-6490. DOI 10.1039/C3CS35484A.

ARCOS, Jose A., HILL, Charles G. et OTERO, Cristina, 2001. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 2001. Vol. 73, n° 2, p. 104-110. DOI 10.1002/bit.1042.

ARENAS-QUEVEDO, Miguel G., ELIZALDE-SOLIS, Octavio, ZÚÑIGA-MORENO, Abel, MACÍAS-SALINAS, Ricardo et GARCÍA-SÁNCHEZ, Fernando, 2017. Solubilities of Palmitic Acid + Capsaicin in Supercritical Carbon Dioxide. In : *Journal of Chemical & Engineering Data*. 9 novembre 2017. Vol. 62, n° 11, p. 3861-3871. DOI 10.1021/acs.jced.7b00576.

ARNÁIZ, E., BERNAL, J., MARTÍN, M. T., NOZAL, M. J., BERNAL, J. L. et TORIBIO, L., 2012. Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves. In : *Journal of Chromatography A*. 10 août 2012. Vol. 1250, p. 49-53. DOI 10.1016/j.chroma.2012.04.066.

ARROYO, M., DE LA MATA, I., ACEBAL, C. et PILAR CASTILLÓN, M., 2003. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 janvier 2003. Vol. 60, n° 5, p. 507-514. DOI 10.1007/s00253-002-1113-6.

ARYA, Ranjana, SABIR, Jamal S. M., BORA, Roop S. et SAINI, Kulvinder S., 2015. Optimization of Culture Parameters and Novel Strategies to Improve Protein Solubility. In : GARCIAFRUITOS, E. (éd.), *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc. p. 45-63. ISBN 978-1-4939-2205-5.

ASHRAF-KHORASSANI, Mehdi, GIDANIAN, Sherli et YAMINI, Yadolah, 1995. Effect of Pressure, Temperature, Modifier, Modifier Concentration, and Sample Matrix on the Supercritical Fluid Extraction Efficiency of Different Phenolic Compounds. In : *Journal of Chromatographic Science*. 1 novembre 1995. Vol. 33, n° 11, p. 658-662. DOI 10.1093/chromsci/33.11.658.

ATTARD, Thomas M. et HUNT, Andrew J., 2018a. CHAPTER 1 Introduction to High-pressure Solvent Systems. In : . 2018a. p. 1-13. DOI 10.1039/9781788013543-00001.

ATTARD, Thomas M. et HUNT, Andrew J., 2018b. CHAPTER 3:Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Lipophilic Molecules. In : *Supercritical and Other High-pressure Solvent Systems* [en ligne]. S.l. : s.n. p. 40-76. [Consulté le 21 juin 2020]. Disponible à l'adresse : <https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781782628804-00040/978-1-78262-880-4>.

AUDIT-ORE, J. V. et WADE, L. H., 1972. N-acetyl-L-asparagine in human brain. In : *Neuropharmacology*. 1 mai 1972. Vol. 11, n° 3, p. 385-394. DOI 10.1016/0028-3908(72)90024-X.

AVINASH, Vellore Sunder, PUNDLE, Archana Vishnu, RAMASAMY, Sureshkumar et SURESH, Cheravakkattu Gopalan, 2016. Penicillin acylases revisited: importance beyond their industrial utility. In : *Critical Reviews in Biotechnology*. 3 mars 2016. Vol. 36, n° 2, p. 303-316. DOI 10.3109/07388551.2014.960359.

AYAKAR, Sonal R. et YADAV, Ganapati D., 2019. Development of novel support for penicillin acylase and its application in 6-aminopenicillanic acid production. In : *Molecular Catalysis*. 1 octobre 2019. Vol. 476, p. 110484. DOI 10.1016/j.mcat.2019.110484.

BACKOV, Rénal, 2012a. *Biocatalyseurs enzymatiques supportés dédiés à la production en continu de biodiesel* [en ligne]. S.l. : s.n. IN150. [Consulté le 12 avril 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/innovation-th10/innovations-en-energie-et-environnement-42503210/biocatalyseurs-enzymatiques-supportes-dedies-a-la-production-en-continu-de-biodiesel-in150/>.

BADGUJAR, Kirtikumar C., DHAKE, Kishor P. et BHANAGE, Bhalchandra M., 2013. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. In : *Process Biochemistry*. 1 septembre 2013. Vol. 48, n° 9, p. 1335-1347. DOI 10.1016/j.procbio.2013.06.009.

BADGUJAR, Kirtikumar Chandulal et BHANAGE, Bhalchandra Mahadeo, 2015. The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 décembre 2015. Vol. 122, p. 255-264. DOI 10.1016/j.molcatb.2015.09.012.

BAKER, C. S., GOJBURG, D. L. et PHILLIPS, A. T., 1997. N-formylglutamate amidohydrolase from *Pseudomonas putida*: Sequence and properties. In : *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*. 1997. Vol. 97, n° 0, p. 370.

BALEN, Manuela, SILVEIRA, Camila, KRATZ, Jadel M., SIMÕES, Cláudia M. O., VALÉRIO, Alexsandra, NINOW, Jorge L., NANDI, Leandro G., DI LUCCIO, Marco et DE OLIVEIRA, Débora, 2015. Novozym® 435-catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system. In : *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1 octobre 2015. Vol. 4, n° 4, p. 514-520. DOI 10.1016/j.bcab.2015.08.008.

BANSODE, Sneha R. et RATHOD, Virendra K., 2018. Enzymatic synthesis of Isoamyl butyrate under microwave irradiation. In : *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*. 1 juillet 2018. Vol. 129, p. 71-76. DOI 10.1016/j.cep.2018.04.015.

BAOLEI, Jia et JEON, Che Ok, 2019. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. In : *Open Biology*. 19 août 2019. Vol. 6, n° 8, p. 160196. DOI 10.1098/rsob.160196.

BARTLE, K. D., CLIFFORD, A. A., JAFAR, S. A. et SHILSTONE, G. F., 1991. Solubilities of Solids and Liquids of Low Volatility in Supercritical Carbon Dioxide. In : *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1 juillet 1991. Vol. 20, n° 4, p. 713-756. DOI 10.1063/1.555893.

BASAK, Souvik, PUNETHA, Vinay Deep, BISHT, Ganga, BISHT, Satpal Singh, SAHOO, Nanda Gopal et CHO, Jae Whan, 2015. Recent Trends of Polymer-Protein Conjugate Application in Biocatalysis: A Review. In : *Polymer Reviews*. 2 janvier 2015. Vol. 55, n° 1, p. 163-198. DOI 10.1080/15583724.2014.971371.

BASSO, Alessandra et SERBAN, Simona, 2019. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. In : *Molecular Catalysis*. 1 décembre 2019. Vol. 479, p. 110607. DOI 10.1016/j.mcat.2019.110607.

BERNAL, Claudia, GUZMAN, Fanny, ILLANES, Andres et WILSON, Lorena, 2018a. Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using

immobilized lipase and protease biocatalysts. In : *Food Chemistry*. 2018. Vol. 239, p. 189-195. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.06.105.

BERNAL, Claudia, ILLANES, Andres et WILSON, Lorena, 2014. Heterofunctional Hydrophilic–Hydrophobic Porous Silica as Support for Multipoint Covalent Immobilization of Lipases: Application to Lactulose Palmitate Synthesis. In : *Langmuir*. 1 avril 2014. Vol. 30, n° 12, p. 3557-3566. DOI 10.1021/la4047512.

BERNAL, Claudia, POVEDA-JARAMILLO, Juan C. et MESA, Monica, 2018. Raising the enzymatic performance of lipase and protease in the synthesis of sugar fatty acid esters, by combined ionic exchange -hydrophobic immobilization process on aminopropyl silica support. In : *Chemical Engineering Journal*. 2018. Vol. 334, p. 760-767. DOI 10.1016/j.cej.2017.10.082.

BERNAL, Claudia, RAMIREZ, Frank, POVEDA-JARAMILLO, Juan C. et MESA, Monica, 2017. New non-covalent functionalized phenyl-methyl-silica for biomolecules immobilization: Experimental and theoretical insights of interactions. In : *Microporous and Mesoporous Materials*. 1 avril 2017. Vol. 242, p. 152-159. DOI 10.1016/j.micromeso.2017.01.033.

BERNAL, Claudia, RODRÍGUEZ, Karen et MARTÍNEZ, Ronny, 2018. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. In : *Biotechnology Advances*. 1 septembre 2018. Vol. 36, n° 5, p. 1470-1480. DOI 10.1016/j.biotechadv.2018.06.002.

BERNAL, Claudia, URRUTIA, Paulina, ILLANES, Andrés et WILSON, Lorena, 2013. Hierarchical meso-macroporous silica grafted with glyoxyl groups: opportunities for covalent immobilization of enzymes. In : *New Biotechnology*. 25 juin 2013. Vol. 30, n° 5, p. 500-506. DOI 10.1016/j.nbt.2013.01.011.

BEZBRADICA, Dejan, CROVIC, Marija, J. TANASKOVIC, Sonja, LUKOVIC, Nevena, CAREVIC, Milica, MILIVOJEVIC, Ana et KNEZEVIC-JUGOVIC, Zorica, 2017. Enzymatic Syntheses of Esters - Green Chemistry for Valuable Food, Fuel and Fine Chemicals. In : [en ligne]. 2017. [Consulté le 19 février 2020]. Disponible à l'adresse : <http://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/coc/2017/00000021/00000002/art00004>.

BEZERRA, Rayanne M., MONTEIRO, Rodolpho R. C., NETO, Davino M. Andrade, DA SILVA, Francisco F. M., DE PAULA, Regina C. M., DE LEMOS, Telma L. G., FECHINE, Pierre B. A., CORREA, Marcio A., BOHN, Felipe, GONÇALVES, Luciana R. B. et DOS SANTOS, José C. S., 2020. A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 août 2020. Vol. 138, p. 109560. DOI 10.1016/j.enzmictec.2020.109560.

BHAVSAR, Kalpesh V. et YADAV, Ganapati D., 2018. Microwave assisted solvent-free synthesis of n-butyl propionate by immobilized lipase as catalyst. In : *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1 avril 2018. Vol. 14, p. 264-269. DOI 10.1016/j.bcab.2018.02.012.

BIDIN, Hasmah, BASRI, Mahiran, RADZI, Salina Mat, ARIFF, Arbakariya, RAHMAN, Raja Noor Zaliha Raja Abdul et SALLEH, Abu Bakar, 2009. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of palm amino acid surfactant using response surface methodology (RSM). In : *Industrial Crops and Products*. septembre 2009. Vol. 30, n° 2, p. 206-211. DOI 10.1016/j.indcrop.2009.03.006.



BIDOUIL, Christelle, BASILIO DE OLIVEIRA, Eduardo, CHEBIL, Latifa, MAIA, Elaine-Rose, MAIGRET, Bernard, RONAT-HEIDT, Evelyne, GHOUL, Mohamed, ENGASSER, Jean-Marc et HUMEAU, Catherine, 2011. Combined docking and molecular dynamics simulations to enlighten the capacity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* lipases to catalyze quercetin acetylation. In : *Journal of Biotechnology*. 10 décembre 2011. Vol. 156, n° 3, p. 203-210. DOI 10.1016/j.jbiotec.2011.09.007.

BISSETT, Donald L., ROBINSON, Larry R., RALEIGH, Patricia S., MIYAMOTO, Kukizo, HAKOZAKI, Tomohiro, LI, Jim et KELM, Gary R., 2009a. Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation by topical N-undecyl-10-enoyl-L-phenylalanine and its combination with niacinamide. In : *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2009. Vol. 8, n° 4, p. 260-266. DOI 10.1111/j.1473-2165.2009.00470.x.

BITTO, Eduard, BINGMAN, Craig A., WESENBERG, Gary E., MCCOY, Jason G. et PHILLIPS, George N., 2007. Structure of aspartoacylase, the brain enzyme impaired in Canavan disease. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9 janvier 2007. Vol. 104, n° 2, p. 456-461. DOI 10.1073/pnas.0607817104.

BLIN, J. L., BLETA, R., GHANBAJA, J. et STÉBÉ, M. J., 2006. Fluorinated emulsions: Templates for the direct preparation of macroporous–mesoporous silica with a highly ordered array of large mesopores. In : *Microporous and Mesoporous Materials*. 8 septembre 2006. Vol. 94, n° 1, p. 74-80. DOI 10.1016/j.micromeso.2006.03.023.

BLIN, Jean-Luc, JACOBY, Jonathan, KIM, Sanghoon, STÉBÉ, Marie-José, CANILHO, Nadia et PASC, Andreea, 2014a. A meso-macro compartmentalized bioreactor obtained through silicalization of “green” double emulsions: W/O/W and W/SLNs/W. In : *Chemical Communications*. 11 septembre 2014. Vol. 50, n° 80, p. 11871-11874. DOI 10.1039/C4CC06007E.

BOMMARIUS, Andreas S, BLUM, Janna K et ABRAHAMSON, Michael J, 2011. Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst. In : *Current Opinion in Chemical Biology*. 1 avril 2011. Vol. 15, n° 2, p. 194-200. DOI 10.1016/j.cbpa.2010.11.011.

BORDES, Florence, BARBE, Sophie, ESCALIER, Pierre, MOUREY, Lionel, ANDRÉ, Isabelle, MARTY, Alain et TRANIER, Samuel, 2010. Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. In : *Biophysical Journal*. 6 octobre 2010. Vol. 99, n° 7, p. 2225-2234. DOI 10.1016/j.bpj.2010.07.040.

BOROS, Zoltán, WEISER, Diána, MÁRKUS, Mária, ABAHÁZIOVÁ, Emese, MAGYAR, Ágnes, TOMIN, Anna, KOCZKA, Béla, KOVÁCS, Péter et POPPE, László, 2013. Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations. In : *Process Biochemistry*. 1 juillet 2013. Vol. 48, n° 7, p. 1039-1047. DOI 10.1016/j.procbio.2013.05.002.

BOURKAIB, Mohamed Chafik, DELAUNAY, Stephane, FRAMBOISIER, Xavier, HÔTEL, Laurence, AIGLE, Bertrand, HUMEAU, Catherine, GUIAVARC'H, Yann et CHEVALOT, Isabelle, 2020. N-acylation of L-amino acids in aqueous media: Evaluation of the catalytic performances of *Streptomyces ambofaciens* aminoacylases. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 juin 2020. Vol. 137, p. 109536. DOI 10.1016/j.enzmictec.2020.109536.

BOURKAIB, Mohamed Chafik, RANDRIAMALALA, Harifeno, DETTORI, Lena, HUMEAU, Catherine, DELAUNAY, Stephane, CHEVALOT, Isabelle et GUIAVARC'H, Yann, 2018. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical

carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations. In : *Process Biochemistry*. 1 août 2018. Vol. 71, p. 118-126. DOI 10.1016/j.procbio.2018.05.008.

BRADFORD, Marion M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In : *Analytical Biochemistry*. 7 mai 1976. Vol. 72, n° 1, p. 248-254. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRADY, Leo, BRZOZOWSKI, Andrzej M., DEREWENDA, Zygmunt S., DODSON, Eleanor, DODSON, Guy, TOLLEY, Shirley, TURKENBURG, Johan P., CHRISTIANSEN, Lars, HUGE-JENSEN, Birgitte, NORSKOV, Leif, THIM, Lars et MENGE, Ulrich, 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. In : *Nature*. février 1990. Vol. 343, n° 6260, p. 767-770. DOI 10.1038/343767a0.

BRITO, Rodrigo O., MARQUES, Eduardo F., SILVA, Sandra G., DO VALE, Maria Luísa, GOMES, Paula, ARAÚJO, Maria J., RODRIGUEZ-BORGES, J. Enrique, INFANTE, Maria Rosa, GARCIA, Maria Teresa, RIBOSA, Isabel, VINARDELL, María Pilar et MITJANS, Montserrat, 2009. Physicochemical and toxicological properties of novel amino acid-based amphiphiles and their spontaneously formed catanionic vesicles. In : *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1 août 2009. Vol. 72, n° 1, p. 80-87. DOI 10.1016/j.colsurfb.2009.03.017.

BRÜHWILER, Dominik, 2010. Postsynthetic functionalization of mesoporous silica. In : *Nanoscale*. 9 juin 2010. Vol. 2, n° 6, p. 887-892. DOI 10.1039/C0NR00039F.

BUCHHOLZ, Klaus, 2016. A breakthrough in enzyme technology to fight penicillin resistance-industrial application of penicillin amidase. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. mai 2016. Vol. 100, n° 9, p. 3825-3839. DOI 10.1007/s00253-016-7399-6.

BUDISA, Nediljko et SCHULZE-MAKUCH, Dirk, 2014. Supercritical Carbon Dioxide and Its Potential as a Life-Sustaining Solvent in a Planetary Environment. In : *Life*. septembre 2014. Vol. 4, n° 3, p. 331-340. DOI 10.3390/life4030331.

BUKHARI, Attaullah, IDRIS, Ani, ATTA, Madiha et LOONG, Teo Chee, 2014. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. In : *Chinese Journal of Catalysis*. 1 septembre 2014. Vol. 35, n° 9, p. 1555-1564. DOI 10.1016/S1872-2067(14)60111-X.

CALDOVIC, Ljubica, LOPEZ, Giselle Y., HASKINS, Nantaporn, PANGLAO, Maria, SHI, Dashuang, MORIZONO, Hiroki et TUCHMAN, Mendel, 2006. Biochemical properties of recombinant human and mouse N-acetylglutamate synthase. In : *Molecular Genetics and Metabolism*. 1 mars 2006. Vol. 87, n° 3, p. 226-232. DOI 10.1016/j.ymgme.2005.10.003.

CANET, Albert, BONET-RAGEL, Kírian, BENAIGES, M. Dolors et VALERO, Francisco, 2016. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. In : *Biomass and Bioenergy*. 1 février 2016. Vol. 85, p. 94-99. DOI 10.1016/j.biombioe.2015.11.021.

CANILHO, N., JACOBY, J., PASC, A., CARTERET, C., DUPIRE, F., STÉBÉ, M. J. et BLIN, J. L., 2013. Isocyanate-mediated covalent immobilization of *Mucor miehei* lipase onto SBA-15 for transesterification reaction. In : *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1 décembre 2013. Vol. 112, p. 139-145. DOI 10.1016/j.colsurfb.2013.07.024.

CAO, Linqiu, 2005a. Covalent Enzyme Immobilization. In : *Carrier-bound Immobilized Enzymes* [en ligne]. S.l. : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p.169-316. [Consulté le 12 juin 2017]. ISBN 978-3-527-60766-2. Disponible à l'adresse : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527607668.ch3/summary>.

- CAO, Linqiu, 2005b. Immobilised enzymes: science or art? In : *Current Opinion in Chemical Biology*. 1 avril 2005. Vol. 9, n° 2, p. 217-226. DOI 10.1016/j.cbpa.2005.02.014.
- CAO, Linqiu, 2005c. Immobilised enzymes: science or art? In : *Current Opinion in Chemical Biology*. 1 avril 2005. Vol. 9, n° 2, p. 217-226. DOI 10.1016/j.cbpa.2005.02.014.
- CAPLOW, Michael, 1968. Kinetics of carbamate formation and breakdown. In : *Journal of the American Chemical Society*. 1 novembre 1968. Vol. 90, n° 24, p. 6795-6803. DOI 10.1021/ja01026a041.
- CARTERET, C., JACOBY, J. et BLIN, J. L., 2018. Using factorial experimental design to optimize biocatalytic biodiesel production from *Mucor Miehei* Lipase immobilized onto ordered mesoporous materials. In : *Microporous and Mesoporous Materials*. 15 septembre 2018. Vol. 268, p. 39-45. DOI 10.1016/j.micromeso.2018.04.004.
- CAVILLE-LEFEBVRE, D. et COMBES, D., 1997. Lipase Synthesis of Short-Chain Flavour Thioesters in Solvent-Free Medium. In : *Biocatalysis and Biotransformation*. 1 janvier 1997. Vol. 15, n° 4, p. 265-279. DOI 10.3109/10242429709003194.
- CEA, Mara, GONZÁLEZ, María Eugenia, ABARZÚA, Macarena et NAVIA, Rodrigo, 2019. Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar. In : *Journal of Environmental Management*. 15 juillet 2019. Vol. 242, p. 171-177. DOI 10.1016/j.jenvman.2019.04.013.
- ČECH, Jiří, SCHROTT, Walter, SLOUKA, Zdeněk, PŘIBYL, Michal, BROŽ, Michal, KUNCOVÁ, Gabriela et ŠNITA, Dalimil, 2012. Enzyme hydrolysis of soybean oil in a slug flow microsystem. In : *Biochemical Engineering Journal*. 15 août 2012. Vol. 67, p. 194-202. DOI 10.1016/j.bej.2012.06.015.
- CELIA, Elena, CERNIA, Enrico, PALOCCI, Cleofe, SORO, Simonetta et TURCHET, Tiziana, 2005. Tuning *Pseudomonas cepacea* lipase (PCL) activity in supercritical fluids. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 février 2005. Vol. 33, n° 2, p. 193-199. DOI 10.1016/j.supflu.2004.07.002.
- CHANKHAMHAENGDECHA, Surang, HONGVIJIT, Suphatra, SRICHAISUPAKIT, Akkaraphol, CHARNCHAI, Pattra et PANBANGRED, Watanalai, 2013. Endophytic Actinomycetes: A Novel Source of Potential Acyl Homoserine Lactone Degrading Enzymes. In : *BioMed Research International* [en ligne]. 2013. [Consulté le 3 octobre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/782847/>.
- CHAPMAN, Robert et STENZEL, Martina H., 2019. All Wrapped up: Stabilization of Enzymes within Single Enzyme Nanoparticles. In : *Journal of the American Chemical Society*. 20 février 2019. Vol. 141, n° 7, p. 2754-2769. DOI 10.1021/jacs.8b10338.
- CHATURVEDI, Shalini, DRISCOLL, William J., ELLIOT, Brenda M., FARADAY, Martha M., GRUNBERG, Neil E. et MUELLER, Gregory P., 2006. In vivo evidence that N-oleoylglycine acts independently of its conversion to oleamide. In : *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 1 décembre 2006. Vol. 81, n° 3, p. 136-149. DOI 10.1016/j.prostaglandins.2006.09.001.
- CHATZAKOS, Vicky, SLÄTIS, Katharina, DJUREINOVIC, Tatjana, HELLEDAY, Thomas et HUNT, Mary C., 2012. N-Acyl Taurines are Anti-Proliferative in Prostate Cancer Cells. In : *Lipids*. 2012. Vol. 47, n° 4, p. 355-361. DOI 10.1007/s11745-011-3639-9.

- CHEBIL, Latifa, ANTHONI, Julie, HUMEAU, Catherine, GERARDIN, Christine, ENGASSER, Jean-Marc et GHOUL, Mohamed, 2007a. Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the Nature of the Substrate, Origin of Lipase, and Operating Conditions on Conversion Yield and Regioselectivity. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 novembre 2007. Vol. 55, n° 23, p. 9496-9502. DOI 10.1021/jf071943j.
- CHEN, Chia-Chen, REDDY, P. Muralidhar, DEVI, C. Shobha, CHANG, Po-Chi et HO, Yen-Peng, 2016. Study of microwave effects on the lipase-catalyzed hydrolysis. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 janvier 2016. Vol. 82, p. 164-172. DOI 10.1016/j.enzmictec.2015.10.003.
- CHOI, Sun-A, OH, You-Kwan, JEONG, Min-Ji, KIM, Seung Wook, LEE, Jin-Suk et PARK, Ji-Yeon, 2014. Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. In : *Renewable Energy*. 1 mai 2014. Vol. 65, p. 169-174. DOI 10.1016/j.renene.2013.08.015.
- CHOI, Young Hae, VAN SPRONSEN, Jaap, DAI, Yuntao, VERBERNE, Marianne, HOLLMANN, Frank, ARENDS, Isabel W.C.E., WITKAMP, Geert-Jan et VERPOORTE, Robert, 2011. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?[W]. In : *Plant Physiology*. août 2011. Vol. 156, n° 4, p. 1701-1705. DOI 10.1104/pp.111.178426.
- CHRASIL, Josef, 1982. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. In : *The Journal of Physical Chemistry*. 1 juillet 1982. Vol. 86, n° 15, p. 3016-3021. DOI 10.1021/j100212a041.
- CHULALAKSANANUKUL, Warawut, CONDORET, Jean-Stéphane et COMBES, Didier, 1993. Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 août 1993. Vol. 15, n° 8, p. 691-698. DOI 10.1016/0141-0229(93)90071-9.
- CLAPÉS, Pere et INFANTE, María Rosa, 2002. Amino Acid-based Surfactants: Enzymatic Synthesis, Properties and Potential Applications. In : *Biocatalysis and Biotransformation*. 1 janvier 2002. Vol. 20, n° 4, p. 215-233. DOI 10.1080/10242420290004947.
- COCERO, M. J, GONZÁLEZ, S, PÉREZ, S et ALONSO, E, 2000. Supercritical extraction of unsaturated products. Degradation of  $\beta$ -carotene in supercritical extraction processes. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 15 novembre 2000. Vol. 19, n° 1, p. 39-44. DOI 10.1016/S0896-8446(00)00077-2.
- COHEN-YESHURUN, Ayelet, WILLNER, Dafna, TREMBOVLER, Victoria, ALEXANDROVICH, Alexander, MECHOULAM, Raphael, SHOHAMI, Esther et LEKER, Ronen R, 2013. N-arachidonoyl-L-serine (AraS) Possesses Proneurogenic Properties in Vitro and in Vivo after Traumatic Brain Injury. In : *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1 août 2013. Vol. 33, n° 8, p. 1242-1250. DOI 10.1038/jcbfm.2013.75.
- COLEMAN, Deborah et GATHERGOOD, Nicholas, 2010. Biodegradation studies of ionic liquids. In : *Chemical Society Reviews*. février 2010. Vol. 39, n° 2, p. 600-637. DOI 10.1039/b817717c.
- COMPTON, Owen C. et NGUYEN, SonBinh T., 2010. Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. In : *Small*. 22 mars 2010. Vol. 6, n° 6, p. 711-723. DOI 10.1002/sml.200901934.
- CONTENTE, Martina Letizia, PINTO, Andrea, MOLINARI, Francesco et PARADISI, Francesca, 2018. Biocatalytic N-Acylation of Amines in Water Using an Acyltransferase from

*Mycobacterium smegmatis*. In : *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2018. Vol. 360, n° 24, p. 4814-4819. DOI 10.1002/adsc.201801061.

COSMETICOBBS, 2015. Les lipoaminoacides - Partie 2 - L'Observatoire des Cosmétiques - Ingrédients - CosmeticOBS. In : [en ligne]. 2015. [Consulté le 24 septembre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://cosmeticobs.com/fr/articles/ingrédients-50/les-lipoaminoacidesnbsppartie-2-2866/>.

COSTA, Susana P. F., AZEVEDO, Ana M. O., PINTO, Paula C. A. G. et SARAIVA, M. Lúcia M. F. S., 2017. Environmental Impact of Ionic Liquids: Recent Advances in (Eco)toxicology and (Bio)degradability. In : *ChemSusChem*. 2017. Vol. 10, n° 11, p. 2321-2347. DOI 10.1002/cssc.201700261.

COUTO, Ricardo, VIDINHA, Pedro, PERES, Célia, RIBEIRO, Adriano S., FERREIRA, Olga, OLIVEIRA, Manuela V., MACEDO, Eugénia A., LOUREIRO, José M. et BARREIROS, Susana, 2011. Geranyl Acetate Synthesis in a Packed-Bed Reactor Catalyzed by Novozym in Supercritical Carbon Dioxide and in Supercritical Ethane. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 16 février 2011. Vol. 50, n° 4, p. 1938-1946. DOI 10.1021/ie101489j.

CUNHA, Sara C. et FERNANDES, José O., 2018. Extraction techniques with deep eutectic solvents. In : *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 août 2018. Vol. 105, p. 225-239. DOI 10.1016/j.trac.2018.05.001.

DAI, Yuntao, VAN SPRONSEN, Jaap, WITKAMP, Geert-Jan, VERPOORTE, Robert et CHOI, Young Hae, 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. In : *Analytica Chimica Acta*. 5 mars 2013. Vol. 766, p. 61-68. DOI 10.1016/j.aca.2012.12.019.

DANIEL, R. M., FINNEY, J. L., STONEHAM, M. et CLARK, Douglas S., 2004. Characteristics of nearly dry enzymes in organic solvents: implications for biocatalysis in the absence of water. In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 29 août 2004. Vol. 359, n° 1448, p. 1299-1307. DOI 10.1098/rstb.2004.1506.

DANIEL, R. M., FINNEY, J. L., STONEHAM, M. et HALLING, Peter J., 2004. What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 29 août 2004. Vol. 359, n° 1448, p. 1287-1297. DOI 10.1098/rstb.2004.1505.

DE ALBUQUERQUE, Tiago Lima, GOMES, Sandy Danielle Lucindo, D'ALMEIDA, Alan Portal, FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto, GONÇALVES, Luciana Rocha Barros et ROCHA, Maria Valderez Ponte, 2018. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. In : *Process Biochemistry*. 1 octobre 2018. Vol. 73, p. 65-73. DOI 10.1016/j.procbio.2018.08.010.

DE DIEGO, Teresa, LOZANO, Pedro, ABAD, Miguel A., STEFFENSKY, Katharina, VAULTIER, Michel et IBORRA, José L., 2009. On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. In : *Journal of Biotechnology*. 25 mars 2009. Vol. 140, n° 3, p. 234-241. DOI 10.1016/j.jbiotec.2009.01.012.

DE LEÓN, Antonio, JIMÉNEZ-ISLAS, Hugo, GONZÁLEZ-CUEVAS, María et DE LA ROSA, Ana Paulina Barba, 2004. Analysis of the expression of the *Trichoderma harzianum* ech42 gene in two isogenic clones of *Escherichia coli* by surface response methodology. In :

*Process Biochemistry*. 29 octobre 2004. Vol. 39, n° 12, p. 2173-2178. DOI 10.1016/j.procbio.2003.11.013.

DE LIMA, Lionete Nunes, MENDES, Adriano Aguiar, FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto, TARDIOLI, Paulo Waldir et GIORDANO, Raquel De Lima Camargo, 2018. Performance of Different Immobilized Lipases in the Syntheses of Short- and Long-Chain Carboxylic Acid Esters by Esterification Reactions in Organic Media. In : *Molecules*. avril 2018. Vol. 23, n° 4, p. 766. DOI 10.3390/molecules23040766.

DE OLIVEIRA, Débora, FILHO, Irajá do Nascimento, DI LUCCIO, Marco, FACCIO, Carina, ROSA, Clarissa Dalla, BENDER, João Paulo, LIPKE, Nádia, AMROGINSKI, Cristiana, DARIVA, Cláudio et DE OLIVEIRA, José Vladimir, 2005. Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. In : *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1 mars 2005. Vol. 121, n° 1, p. 231-241. DOI 10.1385/ABAB:121:1-3:0231.

DE OLIVEIRA, Eduardo B., HUMEAU, Catherine, CHEBIL, Latifa, MAIA, Elaine R., DEHEZ, François, MAIGRET, Bernard, GHOU, Mohamed et ENGASSER, Jean-Marc, 2009. A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 juillet 2009. Vol. 59, n° 1, p. 96-105. DOI 10.1016/j.molcatb.2009.01.011.

DETTORI, L., JELSCH, C., GUIAVARC'H, Y., DELAUNAY, S., FRAMBOISIER, X., CHEVALOT, I. et HUMEAU, C., 2018a. Molecular rules for selectivity in lipase-catalysed acylation of lysine. In : *Process Biochemistry*. 1 novembre 2018. Vol. 74, p. 50-60. DOI 10.1016/j.procbio.2018.07.021.

DETTORI, Léna, 2017. *Approche multi-échelle pour l'étude de la réaction de N-acylation enzymatique d'acides aminés* [en ligne]. thesis. S.l. : Université de Lorraine. [Consulté le 1 octobre 2019]. Disponible à l'adresse : <http://www.theses.fr/2017LORR0346>.

DETTORI, Léna, FERRARI, Florent, FRAMBOISIER, Xavier, PARIS, Cédric, GUIAVARC'H, Yann, HÔTEL, Laurence, AYMES, Arnaud, LEBLOND, Pierre, HUMEAU, Catherine, KAPEL, Romain, CHEVALOT, Isabelle, AIGLE, Bertrand et DELAUNAY, Stéphane, 2017. An aminoacylase activity from *Streptomyces ambofaciens* catalyzes the acylation of lysine on  $\alpha$ -position and peptides on N-terminal position. In : *Engineering in Life Sciences*. 2017. Vol. 18, n° 8, p. 589-599. DOI 10.1002/elsc.201700173.

DETTORI, Lena, VIBERT, François, GUIAVARC'H, Yann, DELAUNAY, Stephane, HUMEAU, Catherine, BLIN, Jean Luc et CHEVALOT, Isabelle, 2018. N- $\alpha$ -acylation of lysine catalyzed by immobilized aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* in aqueous medium. In : *Microporous and Mesoporous Materials*. 1 septembre 2018. Vol. 267, p. 24-34. DOI 10.1016/j.micromeso.2018.03.018.

DIAS, Arthur Luiz Baião, DOS SANTOS, Philipe et MARTÍNEZ, Julian, 2018a. Supercritical CO<sub>2</sub> technology applied to the production of flavor ester compounds through lipase-catalyzed reaction: A review. In : *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*. 1 janvier 2018. Vol. 23, p. 159-178. DOI 10.1016/j.jcou.2017.11.011.

DILLER, David J. et MERZ, Kenneth M., 2001. High throughput docking for library design and library prioritization. In : *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2001. Vol. 43, n° 2, p. 113-124. DOI 10.1002/1097-0134(20010501)43:2<113::AID-PROT1023>3.0.CO;2-T.

DORR, Brent M et FUERST, Douglas E, 2018. Enzymatic amidation for industrial applications. In : *Current Opinion in Chemical Biology*. 1 avril 2018. Vol. 43, p. 127-133. DOI 10.1016/j.cbpa.2018.01.008.

DOS SANTOS, Philipe, MEIRELES, M. Angela A. et MARTÍNEZ, Julian, 2017. Production of isoamyl acetate by enzymatic reactions in batch and packed bed reactors with supercritical CO<sub>2</sub>. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 septembre 2017. Vol. 127, p. 71-80. DOI 10.1016/j.supflu.2017.03.019.

DOS SANTOS, Philipe, REZENDE, Camila A. et MARTÍNEZ, Julian, 2016a. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. janvier 2016. Vol. 107, p. 170-178. DOI 10.1016/j.supflu.2015.08.011.

DOS SANTOS, Philipe, ZABOT, Giovani L., MEIRELES, M. Angela A., MAZUTTI, Marcio A. et MARTÍNEZ, Julian, 2016. Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide. In : *Biochemical Engineering Journal*. 15 octobre 2016. Vol. 114, p. 1-9. DOI 10.1016/j.bej.2016.06.018.

DUAN, Linlin, WANG, Yuanming, ZHANG, Yatao et LIU, Jindun, 2015. Graphene immobilized enzyme/polyethersulfone mixed matrix membrane: Enhanced antibacterial, permeable and mechanical properties. In : *Applied Surface Science*. 15 novembre 2015. Vol. 355, p. 436-445. DOI 10.1016/j.apsusc.2015.07.127.

DUAN, Yu, DU, Zongliang, YAO, Yongyi, LI, Ruixia et WU, Dacheng, 2006. Effect of Molecular Sieves on Lipase-Catalyzed Esterification of Rutin with Stearic Acid. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 août 2006. Vol. 54, n° 17, p. 6219-6225. DOI 10.1021/jf0607617.

DUMONT, T., BARTH, D., CORBIER, C., BRANLANT, G. et PERRUT, M., 1992. Enzymatic reaction kinetic: Comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 20 juin 1992. Vol. 40, n° 2, p. 329-333. DOI 10.1002/bit.260400218.

DURAND, E., LECOMTE, J., BARÉA, B., PIOMBO, G., DUBREUCQ, E. et VILLENEUVE, P., 2012a. Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. In : *Process Biochemistry*. 1 décembre 2012. Vol. 47, n° 12, p. 2081-2089. DOI 10.1016/j.procbio.2012.07.027.

DURAND, E., LECOMTE, J. et VILLENEUVE, P., 2013b. Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. In : *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2013b. Vol. 115, n° 4, p. 379-385. DOI 10.1002/ejlt.201200416.

DURAND, Erwann, 2013a. *Solvants de type eutectiques profonds : nouveaux milieux réactionnels aux réactions de lipophilisation biocatalysées par les lipases ?* [en ligne]. These de doctorat. S.l. : Montpellier 2. [Consulté le 23 juin 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.theses.fr/2013MON20138>.

DURAND, Erwann, LECOMTE, Jérôme, BARÉA, Bruno, DUBREUCQ, Eric, LORTIE, Robert et VILLENEUVE, Pierre, 2013a. Evaluation of deep eutectic solvent–water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. In : *Green Chemistry*. 2013a. Vol. 15, n° 8, p. 2275-2282. DOI 10.1039/C3GC40899J.

DURAND, Erwann, LECOMTE, Jérôme, BARÉA, Bruno et VILLENEUVE, Pierre, 2014. Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep

eutectic solvents based on choline chloride. In : *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2014. Vol. 116, n° 1, p. 16-23. DOI 10.1002/ejlt.201300246.

DURAND, Erwann, LECOMTE, Jérôme et VILLENEUVE, Pierre, 2015a. Are emerging deep eutectic solvents (DES) relevant for lipase-catalyzed lipophilizations? In : *OCL*. 1 juillet 2015. Vol. 22, n° 4, p. D408. DOI 10.1051/ocl/2015026.

DVORAK, Pavel, CHRAST, Lukas, NIKEL, Pablo I., FEDR, Radek, SOUCEK, Karel, SEDLACKOVA, Miroslava, CHALOUPKOVA, Radka, DE LORENZO, Víctor, PROKOP, Zbynek et DAMBORSKY, Jiri, 2015. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. In : *Microbial Cell Factories*. 21 décembre 2015. Vol. 14, n° 1, p. 201. DOI 10.1186/s12934-015-0393-3.

E. HASSAN, Mohamed, 2016. Production, immobilization and industrial uses of penicillin G acylase. In : *Int J Cur Res Rev*. 2016. Vol. 8, n° 15.

EL-BATAL, A. I., ATIA, K. S. et EID, M., 2005. Stabilization of  $\alpha$ -amylase by using anionic surfactant during the immobilization process. In : *Radiation Physics and Chemistry*. 1 octobre 2005. Vol. 74, n° 2, p. 96-101. DOI 10.1016/j.radphyschem.2004.12.006.

ELGHARBAWY, Amal A., RIYADI, Fatimah Azizah, ALAM, Md. Zahangir et MONIRUZZAMAN, Muhammad, 2018. Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review. In : *Journal of Molecular Liquids*. 1 février 2018. Vol. 251, p. 150-166. DOI 10.1016/j.molliq.2017.12.050.

ELGUE, Sebastien, CONTE, Annelise, MARTY, Alain et CONDORET, Jean-Stephane, 2013. Two-phase enzymatic reaction using Process Intensification technologies. In : *Chimica Oggi-Chemistry Today*. décembre 2013. Vol. 31, n° 6, p. 43-46.

ELGUE, Sébastien, CONTÉ, Annelise, MARTY, Alain et CONDORET, Jean-Stéphane, 2014. Continuous lipase esterification using process intensification technologies. In : *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2014. Vol. 89, n° 10, p. 1590-1598. DOI 10.1002/jctb.4247.

END, Nicole et SCHÖNING, Kai-Uwe, 2004. Immobilized Catalysts in Industrial Research and Application. In : KIRSCHNING, A. (éd.), *Immobilized Catalysts: Solid Phases, Immobilization and Applications* [en ligne]. Berlin, Heidelberg : Springer. Topics in Current Chemistry. p. 241-271. [Consulté le 25 juin 2020]. ISBN 978-3-540-39892-9. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.1007/b96878>.

ESCOBAR, Sindy, BERNAL, Claudia, BOLIVAR, Juan M., NIDETZKY, Bernd, LÓPEZ-GALLEGO, Fernando et MESA, Monica, 2018. Understanding the silica-based sol-gel encapsulation mechanism of *Thermomyces lanuginosus* lipase: The role of polyethylenimine. In : *Molecular Catalysis*. 1 avril 2018. Vol. 449, p. 106-113. DOI 10.1016/j.mcat.2018.02.024.

ESCOBAR, Sindy, BERNAL, Claudia et MESA, Monica, 2013. Kinetic study of the colloidal and enzymatic stability of  $\beta$ -galactosidase, for designing its encapsulation route through sol-gel route assisted by Triton X-100 surfactant. In : *Biochemical Engineering Journal*. 15 juin 2013. Vol. 75, p. 32-38. DOI 10.1016/j.bej.2013.03.010.

ESTRUCH, Ilona, TAGLIANI, Auro R., GUISÁN, José Manuel, FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto, ALCÁNTARA, Andrés R., TOMA, Lucio et TERRENI, Marco, 2008. Immobilization of the acylase from *Escherichia coli* on glyoxyl-agarose gives efficient catalyst for the synthesis of cephalosporins. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 janvier 2008. Vol. 42, n° 2, p. 121-129. DOI 10.1016/j.enzmictec.2007.08.013.



FALANY, C. N., JOHNSON, M. R., BARNES, S. et DIASIO, R. B., 1994. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. In : *Journal of Biological Chemistry*. 29 juillet 1994. Vol. 269, n° 30, p. 19375-19379.

FARRELL, Emma K. et MERKLER, David J., 2008. Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of the fatty acid amides. In : *Drug Discovery Today*. 1 juillet 2008. Vol. 13, n° 13, p. 558-568. DOI 10.1016/j.drudis.2008.02.006.

FEI, Xiaoyao, CHEN, Shaoyun, LIU, Dai, HUANG, Chunjie et ZHANG, Yongchun, 2016. Comparison of amino and epoxy functionalized SBA-15 used for carbonic anhydrase immobilization. In : *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1 septembre 2016. Vol. 122, n° 3, p. 314-321. DOI 10.1016/j.jbiosc.2016.02.004.

FENG, Wei et JI, Peijun, 2011. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. In : *Biotechnology Advances*. 1 novembre 2011. Vol. 29, n° 6, p. 889-895. DOI 10.1016/j.biotechadv.2011.07.007.

FERJANCIC-BIAGINI, Anne, GIARDINA, Thierry, REYNIER, Max et PUIGSERVER, Antoine, 1997. Hog Kidney and Intestine Aminoacylase-Catalyzed Acylation of L-Methionine in Aqueous Media. In : *Biocatalysis and Biotransformation*. 1 janvier 1997. Vol. 15, n° 4, p. 313-323. DOI 10.3109/10242429709003197.

FERNANDEZ-LORENTE, Gloria, CABRERA, Zaida, GODOY, Cesar, FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto, PALOMO, Jose M. et GUISAN, Jose M., 2008. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. In : *Process Biochemistry*. 1 octobre 2008. Vol. 43, n° 10, p. 1061-1067. DOI 10.1016/j.procbio.2008.05.009.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, Mónica et OTERO, Cristina, 2001. Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 5 avril 2001. Vol. 28, n° 6, p. 527-536. DOI 10.1016/S0141-0229(01)00293-9.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, Mónica et OTERO, Cristina, 2003. Selective enzymatic synthesis of amide surfactants from diethanolamine. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 8 octobre 2003. Vol. 33, n° 5, p. 650-660. DOI 10.1016/S0141-0229(03)00184-4.

FERRARI, Florent, 2014a. *Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides : prédiction de la sélectivité de la lipase B de Candida antarctica par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases* [en ligne]. thesis. S.l. : Université de Lorraine. [Consulté le 6 mai 2019]. Disponible à l'adresse : <http://www.theses.fr/2014LORR0252>.

FERRARI, Florent, PARIS, Cédric, MAIGRET, Bernard, BIDOUIL, Christelle, DELAUNAY, Stephane, HUMEAU, Catherine et CHEVALOT, Isabelle, 2014a. Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 mars 2014. Vol. 101, p. 122-132. DOI 10.1016/j.molcatb.2013.12.007.

FERREIRA, Guilherme M. D., FERREIRA, Gabriel M. D., ALMEIDA, Germanna W. R., SOARES, Nilda F. F., PIRES, Ana Clarissa S. et SILVA, Luis H. M., 2019. Thermodynamics of multi-walled carbon nanotube biofunctionalization using nisin: The effect of peptide structure. In : *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 5 octobre 2019. Vol. 578, p. 123611. DOI 10.1016/j.colsurfa.2019.123611.

- FILHO, Danielle Gonçalves, SILVA, Amanda Gonçalves et GUIDINI, Carla Zanella, 2019. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 septembre 2019. Vol. 103, n° 18, p. 7399-7423. DOI 10.1007/s00253-019-10027-6.
- FONTES, Nuno, ALMEIDA, M. Conceição, GARCIA, Silvia, PERES, Célia, PARTRIDGE, Johann, HALLING, Peter J. et BARREIROS, Susana, 2001. Supercritical Fluids Are Superior Media for Catalysis by Cross-Linked Enzyme Microcrystals of Subtilisin Carlsberg. In : *Biotechnology Progress*. 2001. Vol. 17, n° 2, p. 355-358. DOI 10.1021/bp000148m.
- FREITAG, Joerg, YOKOYAMA, You, KURAMOCHI, Hidetoshi, KAWAMOTO, Katsuya, NAGAHAMA, Kunio et KATO, Satoru, 2007. Measurements of the solubilities of derivatized amino acids in supercritical carbon dioxide. In : *Fluid Phase Equilibria*. 25 août 2007. Vol. 257, n° 2, p. 201-206. DOI 10.1016/j.fluid.2007.01.032.
- FUENTES, Gloria, BALLESTEROS, Antonio et VERMA, Chandra S., 2004. Specificity in lipases: A computational study of transesterification of sucrose. In : *Protein Science*. 2004. Vol. 13, n° 12, p. 3092-3103. DOI 10.1110/ps.04724504.
- FUJIMOTO, Daisaburo, KOYOMA, Tanetoshi et TAMIYA, Nobuo, 1968. N-acetyl- $\beta$ -alanine deacetylase in hog kidney. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 8 octobre 1968. Vol. 167, n° 2, p. 407-413. DOI 10.1016/0005-2744(68)90220-9.
- FUKUDA, Hirosuke, IWADE, Sumie et KIMURA, Akira, 1982. A New Enzyme: Long Acyl Aminoacylase from *Pseudomonas diminuta*. In : *The Journal of Biochemistry*. 1 avril 1982. Vol. 91, n° 5, p. 1731-1738. DOI 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133865.
- FUKUI, Saburo et TANAKA, Atsuo, 1985. Enzymatic reactions in organic solvents. In : *Endeavour*. 1 janvier 1985. Vol. 9, n° 1, p. 10-17. DOI 10.1016/0160-9327(85)90004-3.
- GAMA, Rafaela S., BOLINA, Iara C. A., CREN, Érika C. et MENDES, Adriano A., 2019. A novel functionalized SiO<sub>2</sub>-based support prepared from biomass waste for lipase adsorption. In : *Materials Chemistry and Physics*. 1 août 2019. Vol. 234, p. 146-150. DOI 10.1016/j.matchemphys.2019.06.002.
- GAO, Li-hong, LIU, Hong-lai, CHAI, Shui-hong, CAI, Yi-feng, LIU, Li-li et WU, Yu-tian, 2002. [Solubility behavior of four diastereomeric salts and two amino acids in near-critical CO<sub>2</sub>]. In : *Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica*. mai 2002. Vol. 37, n° 5, p. 355-358.
- GEHLHAAR, Daniel K., VERKHIVKER, Gennady M., REJTO, Paul A., SHERMAN, Christopher J., FOGEL, David R., FOGEL, Lawrence J. et FREER, Stephan T., 1995. Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. In : *Chemistry & Biology*. 1 mai 1995. Vol. 2, n° 5, p. 317-324. DOI 10.1016/1074-5521(95)90050-0.
- GÉRARD, Doriane, 2016. *Séparation par voie enzymatique d'énantiomères de profènes : optimisation du biocatalyseur et mise en oeuvre en dioxyde de carbone supercritique* [en ligne]. These de doctorat. S.l. : Toulouse, INPT. [Consulté le 20 juin 2020]. Disponible à l'adresse : <http://www.theses.fr/2016INPT0098>.
- GÉRARD, Doriane, CURRIE, Fiona, MEDINA GONZALEZ, Yaocihuatl, CAMY, Séverine, MARTY, Alain et CONDORET, Jean-Stéphane, 2017b. Resolution of 2-bromo-arylacetic acid ester by *Yarrowia lipolytica* lipase in water/supercritical CO<sub>2</sub> two-phase systems. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017b. Vol. 121, p. 96-104. DOI 10.1016/j.supflu.2016.11.012.

- GÉRARD, Doriane, GUÉROULT, Marc, CASAS-GODOY, Leticia, CONDORET, Jean-Stéphane, ANDRÉ, Isabelle, MARTY, Alain et DUQUESNE, Sophie, 2017a. Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered *Yarrowia lipolytica* Lip2p lipase. In : *Tetrahedron: Asymmetry*. 2017a. Vol. 28, n° 3, p. 433-441. DOI 10.1016/j.tetasy.2017.01.014.
- GHANEM, Ashraf, 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. In : *Tetrahedron*. 19 février 2007. Vol. 63, n° 8, p. 1721-1754. DOI 10.1016/j.tet.2006.09.110.
- GLEESON, John P., HEADE, Joanne, RYAN, Sinéad M. et BRAYDEN, David J., 2015. Stability, toxicity and intestinal permeation enhancement of two food-derived antihypertensive tripeptides, Ile-Pro-Pro and Leu-Lys-Pro. In : *Peptides*. 1 septembre 2015. Vol. 71, p. 1-7. DOI 10.1016/j.peptides.2015.05.009.
- GOLDSMITH, Moshe et TAWFIK, Dan S, 2017. Enzyme engineering: reaching the maximal catalytic efficiency peak. In : *Current Opinion in Structural Biology*. 1 décembre 2017. Vol. 47, p. 140-150. DOI 10.1016/j.sbi.2017.09.002.
- GOLDSTEIN, Fred B., 1963. Studies on phenylketonuria II. The excretion of N-acetyl-L-phenylalanine in phenylketonuria. In : *Biochimica et Biophysica Acta*. 1 janvier 1963. Vol. 71, p. 204-206. DOI 10.1016/0006-3002(63)91006-0.
- GOODING, J. Justin et CIAMPI, Simone, 2011. The molecular level modification of surfaces: from self-assembled monolayers to complex molecular assemblies. In : *Chemical Society Reviews*. 18 avril 2011. Vol. 40, n° 5, p. 2704-2718. DOI 10.1039/C0CS00139B.
- GOPAL, Gopal Jee et KUMAR, Awanish, 2013. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. In : *The Protein Journal*. 1 août 2013. Vol. 32, n° 6, p. 419-425. DOI 10.1007/s10930-013-9502-5.
- GORKE, Johnathan T., SRIENC, Friedrich et KAZLAUSKAS, Romas J., 2008a. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. In : *Chemical Communications*. 29 février 2008. n° 10, p. 1235-1237. DOI 10.1039/B716317G.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, Vicente et PAUL, Caroline E., 2019. Deep eutectic solvents for redox biocatalysis. In : *Journal of Biotechnology*. 10 mars 2019. Vol. 293, p. 24-35. DOI 10.1016/j.jbiotec.2018.12.018.
- GOUJARD, L., FIGUEROA, M.C. et VILLENEUVE, P., 2004. Chemo-enzymatic synthesis of N-arachidonoyl glycine. In : *Biotechnology Letters*. 1 août 2004. Vol. 26, n° 15, p. 1211-1216. DOI 10.1023/B:BILE.0000036597.25673.33.
- GRAEBIN, Natália G., MARTINS, Andréa B., LORENZONI, André S. G., GARCIA-GALAN, Cristina, FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto, AYUB, Marco A. Z. et RODRIGUES, Rafael C., 2012. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. In : *Biotechnology Progress*. 2012. Vol. 28, n° 2, p. 406-412. DOI 10.1002/btpr.1508.
- GRBAVČIĆ, Sanja, BEZBRADICA, Dejan, IZRAEL-ŽIVKOVIĆ, Lidija, AVRAMOVIĆ, Nataša, MILOSAVIĆ, Nenad, KARADŽIĆ, Ivanka et KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Zorica, 2011. Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance. In : *Bioresource Technology*. 1 décembre 2011. Vol. 102, n° 24, p. 11226-11233. DOI 10.1016/j.biortech.2011.09.076.

GREBER, Katarzyna E., 2017b. Synthesis and Surface Activity of Cationic Amino Acid-Based Surfactants in Aqueous Solution. In : *Journal of Surfactants and Detergents*. 2017b. Vol. 20, n° 5, p. 1189-1196. DOI 10.1007/s11743-017-2002-4.

GREBER, Katarzyna E., DAWGUL, Malgorzata, KAMYSZ, Wojciech et SAWICKI, Wieslaw, 2017a. Cationic Net Charge and Counter Ion Type as Antimicrobial Activity Determinant Factors of Short Lipopeptides. In : *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 2017a. Vol. 8. [Consulté le 25 septembre 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2017.00123. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00123/full>.

GRIMALDI, Joseph, RADHAKRISHNA, Mithun, KUMAR, Sanat K. et BELFORT, Georges, 2015. Stability of Proteins on Hydrophilic Surfaces. In : *Langmuir*. 27 janvier 2015. Vol. 31, n° 3, p. 1005-1010. DOI 10.1021/la503865b.

GUAJARDO, Nadia, DOMÍNGUEZ DE MARÍA, Pablo, AHUMADA, Katherine, SCHREBLER, Rodrigo A., RAMÍREZ-TAGLE, Rodrigo, CRESPO, Fernando A. et CARLESÍ, Carlos, 2017. Water as Cosolvent: Nonviscous Deep Eutectic Solvents for Efficient Lipase-Catalyzed Esterifications. In : *ChemCatChem*. 21 avril 2017. Vol. 9, n° 8, p. 1393-1396. DOI 10.1002/cctc.201601575.

Le GUENIC, Sarah, CHAVERIAT, Ludovic, LEQUART, Vincent, JOLY, Nicolas et MARTIN, Patrick, 2019. Renewable Surfactants for Biochemical Applications and Nanotechnology. In : *Journal of Surfactants and Detergents*. 2019. Vol. 22, n° 1, p. 5-21. DOI 10.1002/jsde.12216.

GUPTA, Surbhi M., KAMBLE, Manoj P. et YADAV, Ganapati D., 2017. Insight into microwave assisted enzyme catalysis in process intensification of reaction and selectivity: Kinetic resolution of (R,S)-flurbiprofen with alcohols. In : *Molecular Catalysis*. 1 octobre 2017. Vol. 440, p. 50-56. DOI 10.1016/j.mcat.2017.06.020.

HABULIN, Maja et KNEZ, Zeljko, 2001. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. In : *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. décembre 2001. Vol. 76, n° 12, p. 1260-1266. DOI 10.1002/jctb.514.

HABULIN, Maja, ŠABEDER, Saša, PALJEVAC, Muzafera, PRIMOŽIČ, Mateja et KNEZ, Željko, 2007. Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 décembre 2007. Vol. 43, n° 2, p. 199-203. DOI 10.1016/j.supflu.2007.05.001.

HAMBARDZUMYAN, A. A., MKHITARYAN, A. V., PALOYAN, A. M., DADAYAN, S. A. et SAGHYAN, A. S., 2016. Catalytic properties of aminoacylase of strain *Rhodococcus armeniensis* AM6.1. In : *Applied Biochemistry and Microbiology*. mai 2016. Vol. 52, n° 3, p. 250-255. DOI 10.1134/S0003683816030029.

HAMMOND, Oliver S., BOWRON, Daniel T. et EDLER, Karen J., 2016. Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling. In : *Green Chemistry*. 3 mai 2016. Vol. 18, n° 9, p. 2736-2744. DOI 10.1039/C5GC02914G.

HAN, Xue et POLIAKOFF, Martyn, 2012. Continuous reactions in supercritical carbon dioxide: problems, solutions and possible ways forward. In : *Chemical Society Reviews*. 30 janvier 2012. Vol. 41, n° 4, p. 1428-1436. DOI 10.1039/C2CS15314A.

HAN, Yu, LEE, Su Seong et YING, Jackie Y., 2006a. Pressure-Driven Enzyme Entrapment in Siliceous Mesocellular Foam. In : *Chemistry of Materials*. 1 février 2006. Vol. 18, n° 3, p. 643-649. DOI 10.1021/cm0520618.

HANEFELD, Ulf et LEFFERTS, Leon, 2018. *Catalysis: An Integrated Textbook for Students*. S.l. : John Wiley & Sons. ISBN 978-3-527-34159-7.

HARADA, Tadao, KUBOTA, Yuki, KAMITANAKA, Takashi, NAKAMURA, Kaoru et MATSUDA, Tomoko, 2009a. A novel method for enzymatic asymmetric reduction of ketones in a supercritical carbon dioxide/water biphasic system. In : *Tetrahedron Letters*. 26 août 2009. Vol. 50, n° 34, p. 4934-4936. DOI 10.1016/j.tetlet.2009.06.063.

HARTMANN, Martin et KOSTROV, Xenia, 2013a. Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. In : *Chemical Society Reviews*. 8 juillet 2013. Vol. 42, n° 15, p. 6277-6289. DOI 10.1039/C3CS60021A.

HAYYAN, Adeeb, HASHIM, Mohd Ali, HAYYAN, Maan, MJALLI, Farouq S. et ALNASHEF, Inas M., 2014. A new processing route for cleaner production of biodiesel fuel using a choline chloride based deep eutectic solvent. In : *Journal of Cleaner Production*. 15 février 2014. Vol. 65, p. 246-251. DOI 10.1016/j.jclepro.2013.08.031.

HAYYAN, Adeeb, MJALLI, Farouq S., ALNASHEF, Inas M., AL-WAHAIBI, Talal, AL-WAHAIBI, Yahya M. et HASHIM, Mohd Ali, 2012. Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. In : *Thermochimica Acta*. 10 août 2012. Vol. 541, p. 70-75. DOI 10.1016/j.tca.2012.04.030.

HAYYAN, Maan, HASHIM, Mohd Ali, AL-SAAD, Mohammed A., HAYYAN, Adeeb, ALNASHEF, Inas M. et MIRGHANI, Mohamed E. S., 2013. Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. In : *Chemosphere*. 1 septembre 2013. Vol. 93, n° 2, p. 455-459. DOI 10.1016/j.chemosphere.2013.05.013.

HAYYAN, Maan, HASHIM, Mohd Ali, HAYYAN, Adeeb, AL-SAAD, Mohammed A., ALNASHEF, Inas M., MIRGHANI, Mohamed E. S. et SAHEED, Olorunnisola Kola, 2013. Are deep eutectic solvents benign or toxic? In : *Chemosphere*. 1 février 2013. Vol. 90, n° 7, p. 2193-2195. DOI 10.1016/j.chemosphere.2012.11.004.

HEESE, Dirk, BERGER, Stefan et RÖHM, Klaus-Heinrich, 1990. Nuclear magnetic relaxation studies of the role of the metal ion in Mn<sup>2+</sup>-substituted aminoacylase I. In : *European Journal of Biochemistry*. 1990. Vol. 188, n° 1, p. 175-180. DOI 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15385.x.

HENSELING, J. et ROHM, Kh, 1988. Aminoacylase-I from Hog Kidney - Anion Effects and the Ph-Dependence of Kinetic-Parameters. In : *Biochimica Et Biophysica Acta*. 15 avril 1988. Vol. 959, n° 3, p. 370-377. DOI 10.1016/0005-2760(88)90211-1.

HENTCHEL, Kristy L. et ESCALANTE-SEMERENA, Jorge C., 2015. Acylation of Biomolecules in Prokaryotes: a Widespread Strategy for the Control of Biological Function and Metabolic Stress. In : *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1 septembre 2015. Vol. 79, n° 3, p. 321-346. DOI 10.1128/MMBR.00020-15.

HENTRICH, W, KEPPLER, H et HINTZMANN, K, 1936. 635,522. 1936.

HERMANOVÁ, Soňa, ZAREVÚCKÁ, Marie, BOUŠA, Daniel, PUMERA, Martin et SOFER, Zdeněk, 2015. Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability. In : *Nanoscale*. 19 mars 2015. Vol. 7, n° 13, p. 5852-5858. DOI 10.1039/C5NR00438A.

HOANG, Hai Nam, ARE, Kristian Ray Angelo et MATSUDA, Tomoko, 2018. CHAPTER 7: Biocatalysis in Supercritical and Liquid Carbon Dioxide and Carbon Dioxide-expanded Liquids. In : *Supercritical and Other High-pressure Solvent Systems* [en ligne]. S.l. : s.n. p. 191-220. [Consulté le 21 juin 2020]. Disponible à l'adresse : <https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781782628804-00191/978-1-78262-880-4>.

HOARAU, Marie, BADIEYAN, Somayesadat et MARSH, E. Neil G., 2017. Immobilized enzymes: understanding enzyme – surface interactions at the molecular level. In : *Organic & Biomolecular Chemistry*. 22 novembre 2017. Vol. 15, n° 45, p. 9539-9551. DOI 10.1039/C7OB01880K.

HOBBS, Helen R., KONDOR, Betti, STEPHENSON, Phil, SHELDON, Roger A., THOMAS, Neil R. et POLIAKOFF, Martyn, 2006. Continuous kinetic resolution catalysed by cross-linked enzyme aggregates, 'CLEAs', in supercritical CO<sub>2</sub>. In : *Green Chemistry*. 1 septembre 2006. Vol. 8, n° 9, p. 816-821. DOI 10.1039/B604738F.

HOBBS, Helen R. et THOMAS, Neil R., 2007. Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and under Solvent-Free Conditions. In : *Chemical Reviews*. 1 juin 2007. Vol. 107, n° 6, p. 2786-2820. DOI 10.1021/cr0683820.

HOLMQUIST, M., 2000. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. In : *Current Protein & Peptide Science*. septembre 2000. Vol. 1, n° 2, p. 209-235. DOI 10.2174/1389203003381405.

HOMMES, Arne, DE WIT, Tom, EUVERINK, Gerrit Jan Willem et YUE, Jun, 2019. Enzymatic Biodiesel Synthesis by the Biphasic Esterification of Oleic Acid and 1-Butanol in Microreactors. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 28 août 2019. Vol. 58, n° 34, p. 15432-15444. DOI 10.1021/acs.iecr.9b02693.

HOUSAINDOKHT, Mohammad Reza, BOZORGMEHR, Mohammad Reza et MONHEMI, Hassan, 2012. Structural behavior of *Candida antarctica* lipase B in water and supercritical carbon dioxide: A molecular dynamic simulation study. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 mars 2012. Vol. 63, p. 180-186. DOI 10.1016/j.supflu.2011.12.010.

HSIEH, Jennifer M., TSIRULNIKOV, Kirill, SAWAYA, Michael R., MAGILNICK, Nathaniel, ABULADZE, Natalia, KURTZ, Ira, ABRAMSON, Jeff et PUSHKIN, Alexander, 2010. Structures of aminoacylase 3 in complex with acetylated substrates. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19 octobre 2010. Vol. 107, n° 42, p. 17962-17967. DOI 10.1073/pnas.1006687107.

HU, L, MULFINGER, L M et PHILLIPS, A T, 1987. Purification and properties of formylglutamate amidohydrolase from *Pseudomonas putida*. In : *Journal of Bacteriology*. octobre 1987. Vol. 169, n° 10, p. 4696-4702.

HU, Lizhi, LLIBIN, Sun, LI, Jun, QI, Liangjun, ZHANG, Xu, YU, Dianyu, WALID, Elfalleh et JIANG, Lianzhou, 2015. Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil and phytosterol in supercritical CO<sub>2</sub>. In : *Bioprocess and Biosystems Engineering*. décembre 2015. Vol. 38, n° 12, p. 2343-2347. DOI 10.1007/s00449-015-1469-5.

HUANG, Susan M., BISOGNO, Tiziana, PETROS, Timothy J., CHANG, Sai Y., ZAVITSANOS, Paul A., ZIPKIN, Robert E., SIVAKUMAR, Ramachandran, COOP, Andrew, MAEDA, Dean Y., PETROCELLIS, Luciano De, BURSTEIN, Sumner, MARZO, Vincenzo Di et WALKER, J. Michael, 2001. Identification of a New Class of Molecules, the Arachidonyl Amino Acids, and Characterization of One Member That Inhibits Pain. In : *Journal of*

*Biological Chemistry*. 16 novembre 2001. Vol. 276, n° 46, p. 42639-42644. DOI 10.1074/jbc.M107351200.

HUBERT, Florence, POISSON, Laurent, LOISEAU, Céline, GAUVRY, Laurent, PENCRÉAC'H, Gaëlle, HÉRAULT, Josiane et ERGAN, Françoise, 2017. Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*. In : *OCL*. 1 juillet 2017. Vol. 24, n° 4, p. D407. DOI 10.1051/ocl/2017023.

HULIN, Lise, HUSSON, Eric, BONNET, Jean-Pierre, STEVANOVIC, Tatjana et SARAZIN, Catherine, 2015. Enzymatic Transesterification of Kraft Lignin with Long Acyl Chains in Ionic Liquids. In : *Molecules*. septembre 2015. Vol. 20, n° 9, p. 16334-16353. DOI 10.3390/molecules200916334.

HUMEAU, C, GIRARDIN, M, ROVEL, B et MICLO, A, 1998. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. In : *Journal of Biotechnology*. 30 juillet 1998. Vol. 63, n° 1, p. 1-8. DOI 10.1016/S0168-1656(98)00069-8.

HUSSON, Éric, 2008. *Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique* [en ligne]. These de doctorat. S.l. : Vandoeuvre-les-Nancy, INPL. [Consulté le 22 juin 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.theses.fr/2008INPL061N>.

HUSSON, Eric, GARCIA-MATILLA, Veronica, HUMEAU, Catherine, CHEVALOT, Isabelle, FOURNIER, Frantz et MARC, Ivan, 2010a. Enzymatic acylation of a bifunctional molecule in 2-methyl-2-butanol: Kinetic modelling. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 5 avril 2010. Vol. 46, n° 5, p. 338-346. DOI 10.1016/j.enzmictec.2009.11.008.

HUSSON, Eric, HUMEAU, Catherine, BLANCHARD, Fabrice, FRAMBOISIER, Xavier, MARC, Ivan et CHEVALOT, Isabelle, 2008a. Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 novembre 2008. Vol. 55, n° 3, p. 110-117. DOI 10.1016/j.molcatb.2008.02.004.

HUSSON, Eric, HUMEAU, Catherine, HARSCOAT, Christelle, FRAMBOISIER, Xavier, PARIS, Cedric, DUBREUCQ, Eric, MARC, Ivan et CHEVALOT, Isabelle, 2011. Enzymatic acylation of the polar dipeptide, carnosine: Reaction performances in organic and aqueous media. In : *Process Biochemistry*. 1 avril 2011. Vol. 46, n° 4, p. 945-952. DOI 10.1016/j.procbio.2011.01.007.

HUSSON, Eric, HUMEAU, Catherine, PARIS, Cédric, VANDERESSE, Régis, FRAMBOISIER, Xavier, MARC, Ivan et CHEVALOT, Isabelle, 2009a. Enzymatic acylation of polar dipeptides: Influence of reaction media and molecular environment of functional groups. In : *Process Biochemistry*. 1 avril 2009. Vol. 44, n° 4, p. 428-434. DOI 10.1016/j.procbio.2008.12.011.

IKUSHIMA, Y., SAITO, N., HATAKEDA, K. et SATO, O., 1996. Promotion of a lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide in the near-critical region. In : *Chemical Engineering Science*. 1 juin 1996. Vol. 51, n° 11, p. 2817-2822. DOI 10.1016/0009-2509(96)00158-3.

INFANTE, Ma Rosa, PÉREZ, Lourdes, MORÁN, Ma Carmen, PONS, Ramon, MITJANS, Montserrat, VINARDELL, Ma Pilar, GARCIA, Ma Teresa et PINAZO, Aurora, 2010. Biocompatible surfactants from renewable hydrophiles. In : *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010. Vol. 112, n° 1, p. 110-121. DOI 10.1002/ejlt.200900110.

ISHII, Y., SAITO, Y., FUJIMURA, T., SASAKI, H., NOGUCHI, Y., YAMADA, H., NIWA, M. et SHIMOMURA, K., 1995. High-level production, chemical modification and site-directed mutagenesis of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176. In : *European Journal of Biochemistry*. 1 juin 1995. Vol. 230, n° 2, p. 773-778.

ISHIZUKA, Fumi, CHAPMAN, Robert, KUCHEL, Rhiannon P., COUREAULT, Marion, ZETTERLUND, Per B. et STENZEL, Martina H., 2018. Polymeric Nanocapsules for Enzyme Stabilization in Organic Solvents. In : *Macromolecules*. 23 janvier 2018. Vol. 51, n° 2, p. 438-446. DOI 10.1021/acs.macromol.7b02377.

IYER, Padma V. et ANANTHANARAYAN, Laxmi, 2008. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. In : *Process Biochemistry*. 1 octobre 2008. Vol. 43, n° 10, p. 1019-1032. DOI 10.1016/j.procbio.2008.06.004.

IZUMI, Taeko, YAGIMUMA, Yoshihiro et HAGA, Masanori, 1997. Enzymatic syntheses of N-lauroyl- $\beta$ -alanine homologs in organic media. In : *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1997. Vol. 74, n° 7, p. 875-878. DOI 10.1007/s11746-997-0231-9.

JACOBY, J., PASC, A., CARTERET, C., DUPIRE, F., STÉBÉ, M. J., COUPARD, V. et BLIN, J. L., 2013. Ordered mesoporous materials containing *Mucor Miehei* Lipase as biocatalyst for transesterification reaction. In : *Process Biochemistry*. 1 mai 2013. Vol. 48, n° 5, p. 831-837. DOI 10.1016/j.procbio.2013.04.003.

JAIN, A. N., 1996. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. In : *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. octobre 1996. Vol. 10, n° 5, p. 427-440. DOI 10.1007/BF00124474.

JASTORFF, Bernd, STÖRMANN, Reinhold, RANKE, Johannes, MÖLTER, Kerstin, STOCK, Frauke, OBERHEITMANN, Boris, HOFFMANN, Wolfgang, HOFFMANN, Jens, NÜCHTER, Matthias, ONDRUSCHKA, Bernd et FILSER, Juliane, 2003. How hazardous are ionic liquids? Structure–activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. In : *Green Chemistry*. 8 avril 2003. Vol. 5, n° 2, p. 136-142. DOI 10.1039/B211971D.

JAVED, Saira, AZEEM, Farrukh, HUSSAIN, Sabir, RASUL, Ijaz, SIDDIQUE, Muhammad Hussnain, RIAZ, Muhammad, AFZAL, Muhammad, KOUSER, Ambreen et NADEEM, Habibullah, 2018. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. In : *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1 janvier 2018. Vol. 132, p. 23-34. DOI 10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014.

JIANG, Chunyue, PAN, Qinmin et PAN, Zuren, 1998. Solubility behavior of solids and liquids in compressed gases. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 15 mars 1998. Vol. 12, n° 1, p. 1-9. DOI 10.1016/S0896-8446(97)00042-9.

JIANG, Liyan, XIE, Xiaona, YUE, Hong, WU, Zhuofu, WANG, Haoran, YANG, Fengjuan, WANG, Lei et WANG, Zhi, 2015. Highly efficient and regioselective acylation of arbutin catalyzed by lipase from *Candida* sp. In : *Process Biochemistry*. 1 mai 2015. Vol. 50, n° 5, p. 789-792. DOI 10.1016/j.procbio.2015.02.014.

JOHN KENNEDY, L., SELVI, P. K., ARUNA PADMANABHAN, HEMA, K. N. et SEKARAN, G., 2007. Immobilization of polyphenol oxidase onto mesoporous activated carbons – isotherm and kinetic studies. In : *Chemosphere*. 1 septembre 2007. Vol. 69, n° 2, p. 262-270. DOI 10.1016/j.chemosphere.2007.04.001.



JOONDAN, Nausheen, JHAUMEER-LAULLOO, Sabina, CAUMUL, Prakashanand et AKERMAN, Matthew, 2017. Synthesis, physicochemical, and biological activities of novel N-acyl tyrosine monomeric and Gemini surfactants in single and SDS/CTAB-mixed micellar system. In : *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2017. Vol. 30, n° 10, p. e3675. DOI 10.1002/poc.3675.

JOONDAN, Nausheen, LAULLOO, Sabina Jhaumeer et CAUMUL, Prakashanand, 2018. Amino acids: Building blocks for the synthesis of greener amphiphiles. In : *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2 novembre 2018. Vol. 39, n° 11, p. 1550-1564. DOI 10.1080/01932691.2017.1421085.

JOUYBAN, Abolghasem, CHAN, Hak-Kim et FOSTER, Neil R., 2002. Mathematical representation of solute solubility in supercritical carbon dioxide using empirical expressions. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 septembre 2002. Vol. 24, n° 1, p. 19-35. DOI 10.1016/S0896-8446(02)00015-3.

JUNEIDI, Ibrahim, HAYYAN, Maan et HASHIM, Mohd Ali, 2018. Intensification of biotransformations using deep eutectic solvents: Overview and outlook. In : *Process Biochemistry*. 1 mars 2018. Vol. 66, p. 33-60. DOI 10.1016/j.procbio.2017.12.003.

JUNG, Dirk, PARADISO, Michelangelo et HARTMANN, Martin, 2009. Formation of cross-linked glucose oxidase aggregates in mesocellular foams. In : *Journal of Materials Science*. 1 décembre 2009. Vol. 44, n° 24, p. 6747-6753. DOI 10.1007/s10853-009-3917-6.

KALIA, Vipin Chandra, 2014. In search of versatile organisms for quorum-sensing inhibitors: acyl homoserine lactones (AHL)-acylase and AHL-lactonase. In : *FEMS Microbiology Letters*. 1 octobre 2014. Vol. 359, n° 2, p. 143-143. DOI 10.1111/1574-6968.12585.

KAMAT, Sanjay, BARRERA, Juliet, BECKMAN, J. et RUSSELL, Alan J., 1992. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: I. Optimization of enzyme environment. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 1992. Vol. 40, n° 1, p. 158-166. DOI 10.1002/bit.260400122.

KAMAT, Sv, BECKMAN, Ej et RUSSELL, Aj, 1995. Enzyme-Activity in Supercritical Fluids. In : *Critical Reviews in Biotechnology*. 1995. Vol. 15, n° 1, p. 41-71. DOI 10.3109/07388559509150531.

KAMBLE, Manoj P. et YADAV, Ganapati D., 2017. Kinetic Resolution of (R,S)- $\alpha$ -Tetralol by Immobilized *Candida antarctica* Lipase B: Comparison of Packed-Bed over Stirred-Tank Batch Bioreactor. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 22 février 2017. Vol. 56, n° 7, p. 1750-1757. DOI 10.1021/acs.iecr.6b03401.

KANG, Yu, HE, Jing, GUOGUO, Xiaodan, GUO et SONG, Zhihong, 2007. Influence of Pore Diameters on the Immobilization of Lipase in SBA-15. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 1 juin 2007. Vol. 46, n° 13, p. 4474-4479. DOI 10.1021/ie061440n.

KATO, Katsuya et SEELAN, Sindhu, 2010. Enhancing activity and stability of *Burkholderia cepacia* lipase by immobilization on surface-functionalized mesoporous silicates. In : *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1 juin 2010. Vol. 109, n° 6, p. 615-617. DOI 10.1016/j.jbiosc.2009.11.008.

KELLEY, Michael et VESSEY, Donald A., 1994. Characterization of the acyl-CoA: Amino acid N-acyltransferases from primate liver mitochondria. In : *Journal of Biochemical Toxicology*. 1994. Vol. 9, n° 3, p. 153-158. DOI 10.1002/jbt.2570090307.

- KESKIN, Seda, KAYRAK-TALAY, Defne, AKMAN, Uğur et HORTAÇSU, Öner, 2007a. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. novembre 2007. Vol. 43, n° 1, p. 150-180. DOI 10.1016/j.supflu.2007.05.013.
- KHAN, Nishat R., JADHAV, Sachin V. et RATHOD, Virendra K., 2015. Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies. In : *Ultrasonics Sonochemistry*. 1 novembre 2015. Vol. 27, p. 522-529. DOI 10.1016/j.ultsonch.2015.03.017.
- KHAN, Nishat R. et RATHOD, Virendra K., 2015. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. In : *Process Biochemistry*. novembre 2015. Vol. 50, n° 11, p. 1793-1806. DOI 10.1016/j.procbio.2015.07.014.
- KHODAVERDIAN, Shima, DABIRMANESH, Bahareh, HEYDARI, Akbar, DASHTBAN-MOGHADAM, Elahe, KHAJEH, Khosro et GHAZI, Farideh, 2018. Activity, stability and structure of laccase in betaine based natural deep eutectic solvents. In : *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 février 2018. Vol. 107, p. 2574-2579. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.144.
- KIM, Jin Kwang, YANG, In Seok, RHEE, Sangkee, DAUTER, Zbigniew, LEE, Young Sik, PARK, Sung Soo et KIM, Kyung Hyun, 2003. Crystal structures of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase: insight into autoproteolytic activation. In : *Biochemistry*. 15 avril 2003. Vol. 42, n° 14, p. 4084-4093. DOI 10.1021/bi027181x.
- KIM, Sanghoon, JACOBY, Jonathan, STEBE, Marie-José, CANILHO, Nadia et PASC, Andreea, 2015. *Solid Lipid Nanoparticle - Functional Template of Meso-Macrostructured Silica Materials* [en ligne]. S.l. : American Chemical Society. [Consulté le 18 février 2020]. ISBN 978-0-8412-3065-1. Disponible à l'adresse : <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01959404>.
- KLEINER, Beatrice, FLEISCHER, Peter et SCHÖRKEN, Ulrich, 2016. Biocatalytic synthesis of biodiesel utilizing deep eutectic solvents: A two-step-one-pot approach with free lipases suitable for acidic and used oil processing. In : *Process Biochemistry*. 1 novembre 2016. Vol. 51, n° 11, p. 1808-1816. DOI 10.1016/j.procbio.2015.10.016.
- KLIBANOV, Alexander M., 1989. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. In : *Trends in Biochemical Sciences*. 1 avril 1989. Vol. 14, n° 4, p. 141-144. DOI 10.1016/0968-0004(89)90146-1.
- KNEZ, Ž., HABULIN, M. et KRMELJ, V., 1998. Enzyme catalyzed reactions in dense gases. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 octobre 1998. Vol. 14, n° 1, p. 17-29. DOI 10.1016/S0896-8446(98)00097-7.
- KNEZ, Željko, 2018a. Enzymatic reactions in subcritical and supercritical fluids. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 avril 2018. Vol. 134, p. 133-140. DOI 10.1016/j.supflu.2017.11.023.
- KNEZ, Željko et HABULIN, Maja, 2002. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 mai 2002. Vol. 23, n° 1, p. 29-42. DOI 10.1016/S0896-8446(01)00138-3.
- KNEZ, Željko, KAVČIČ, Sabina, GUBICZA, László, BÉLAFI-BAKÓ, Katalin, NÉMETH, Gergely, PRIMOŽIČ, Mateja et HABULIN, Maja, 2012. Lipase-catalyzed esterification of lactic acid in supercritical carbon dioxide. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 juin 2012. Vol. 66, p. 192-197. DOI 10.1016/j.supflu.2011.11.006.

KOHNO, Mitsutaka, FUNATSU, Jiro, MIKAMI, Bunzo, KUGIMIYA, Wataru, MATSUO, Takaharu et MARITA, Yuhei, 1996. The Crystal Structure of Lipase II from *Rhizopus niveus* at 2.2 Å Resolution. In : *The Journal of Biochemistry*. 1 septembre 1996. Vol. 120, n° 3, p. 505-510. DOI 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021442.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, Agnieszka, ZDARTA, Jakub et JESIONOWSKI, Teofil, 2018. Physicochemical and catalytic properties of acylase I from *Aspergillus melleus* immobilized on amino- and carbonyl-grafted stöber silica. In : *Biotechnology Progress*. 2018. Vol. 34, n° 3, p. 767-777. DOI 10.1002/btpr.2610.

KONTOGIANNI, Athina, SKOURIDOU, Vasso, SERETI, Vasiliki, STAMATIS, Haralambos et KOLISIS, Fragiskos N., 2001. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. In : *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2001. Vol. 103, n° 10, p. 655-660. DOI 10.1002/1438-9312(200110)103:10<655::AID-EJLT655>3.0.CO;2-X.

KOREISHI, Mayuko, ASAYAMA, Fumiaki, IMANAKA, Hiroyuki, IMAMURA, Koreyoshi, KADOTA, Megumi, TSUNO, Takuo et NAKANISHI, Kazuhiro, 2005a. Purification and Characterization of a Novel Aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*. In : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2005a. Vol. 69, n° 10, p. 1914-1922. DOI 10.1271/bbb.69.1914.

KOREISHI, Mayuko, KAWASAKI, Ryoko, IMANAKA, Hiroyuki, IMAMURA, Koreyoshi et NAKANISHI, Kazuhiro, 2005b. A novel  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of N $\epsilon$ -acyl-L-lysines. In : *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2005b. Vol. 82, n° 9, p. 631-637. DOI 10.1007/s11746-005-1121-2.

KOREISHI, Mayuko, KAWASAKI, Ryoko, IMANAKA, Hiroyuki, IMAMURA, Koreyoshi, TAKAKURA, Yasuaki et NAKANISHI, Kazuhiro, 2009a. Efficient N $\epsilon$ -lauroyl-L-lysine production by recombinant  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis*. In : *Journal of Biotechnology*. 2009a. Vol. 141, n° 3, p. 160-165. DOI 10.1016/j.jbiotec.2009.03.008.

KOREISHI, Mayuko, NAKATANI, Yasuyuki, OOI, Manami, IMANAKA, Hiroyuki, IMAMURA, Koreyoshi et NAKANISHI, Kazuhiro, 2009b. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of a New Aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis* That Can Hydrolyze N-(Middle/Long)-chain-fatty-acyl-L-amino Acids as Well as N-Short-chain-acyl-L-amino acids. In : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2009b. Vol. 73, n° 9, p. 1940-1947. DOI 10.1271/bbb.90081.

KOREISHI, Mayuko, TANI, Kazuha, ISE, Yuuichi, IMANAKA, Hiroyuki, IMAMURA, Koreyoshi et NAKANISHI, Kazuhiro, 2007a. Enzymatic Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics and N-Fatty-Acylated Amino Compounds by the Acyl-Transfer Reaction Catalyzed by Penicillin V Acylase from *Streptomyces mobaraensis*. In : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 23 juin 2007. Vol. 71, n° 6, p. 1582-1586. DOI 10.1271/bbb.70052.

KOREISHI, Mayuko, ZHANG, Demin, IMANAKA, Hiroyuki, IMAMURA, Koreyoshi, ADACHI, Shuji, MATSUNO, Ryuichi et NAKANISHI, Kazuhiro, 2006a. A Novel Acylase from *Streptomyces mobaraensis* that Efficiently Catalyzes Hydrolysis/Synthesis of Capsaicins as Well as N-Acyl-L-amino Acids and N-Acyl-peptides. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 janvier 2006. Vol. 54, n° 1, p. 72-78. DOI 10.1021/jf052102k.

KOSÁRY, J., SISAK, C. S., SZAJANI, B. et BOROSS, L., 1994. Acylation of Amino Acids by Aminoacylase in Non-Conventional Media. In : *Biocatalysis*. 1 janvier 1994. Vol. 11, n° 4, p. 329-337. DOI 10.3109/10242429409008865.

KOSÁRY, J., SZAJÁNI, B. et BOROSS, L., 1992. Behaviour of Soluble Aminoacylase in Water-Organic Solvent Mixtures. In : TRAMPER, J., VERMÜE, M. H., BEEFTINK, H. H. et VON STOCKAR, U. (éd.), *Progress in Biotechnology*. 1 janvier 1992. Vol. 8, p. 609-614. DOI 10.1016/B978-0-444-89046-7.50088-6.

KOTS, Ekaterina D., KHRENOVA, Maria G., NEMUKHIN, Alexander V. et VARFOLOMEEV, Sergei D., 2019. Aspartoacylase: a central nervous system enzyme. Structure, catalytic activity and regulation mechanisms. In : *Russian Chemical Reviews*. 2019. Vol. 88, n° 1, p. 1-26. DOI 10.1070/RCR4842.

KRAAI, G. N., WINKELMAN, J. G. M., DE VRIES, J. G. et HEERES, H. J., 2008. Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. In : *Biochemical Engineering Journal*. 1 août 2008. Vol. 41, n° 1, p. 87-94. DOI 10.1016/j.bej.2008.03.011.

KRAMMER, André, KIRCHHOFF, Paul D., JIANG, X., VENKATACHALAM, C. M. et WALDMAN, Marvin, 2005. LigScore: a novel scoring function for predicting binding affinities. In : *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 1 avril 2005. Vol. 23, n° 5, p. 395-407. DOI 10.1016/j.jmgm.2004.11.007.

KRISHNA, S. Hari et KARANTH, N. G., 2002. Lipases and Lipase-Catalyzed Esterification Reactions in Nonaqueous Media. In : *Catalysis Reviews*. 31 décembre 2002. Vol. 44, n° 4, p. 499-591. DOI 10.1081/CR-120015481.

KUMAR, Sanat K. et JOHNSTON, Keith P., 1988. Modelling the solubility of solids in supercritical fluids with density as the independent variable. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 janvier 1988. Vol. 1, n° 1, p. 15-22. DOI 10.1016/0896-8446(88)90005-8.

KUMARESAN, J., KOTHAI, T. et LAKSHMI, B. S., 2011. In silico approaches towards understanding CALB using molecular dynamics simulation and docking. In : *Molecular Simulation*. 1 octobre 2011. Vol. 37, n° 12, p. 1053-1061. DOI 10.1080/08927022.2011.589050.

LAMBA, Neha, NARAYAN, Ram C., MODAK, Jayant et MADRAS, Giridhar, 2016. Solubilities of 10-undecenoic acid and geraniol in supercritical carbon dioxide. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 janvier 2016. Vol. 107, p. 384-391. DOI 10.1016/j.supflu.2015.09.026.

LANGEN, Luuk M. van, JANSSEN, Michiel H. A., OOSTHOEK, Natasja H. P., PEREIRA, Sílvia R. M., ŠVEDAS, Vytas K., RANTWIJK, Fred van et SHELDON, Roger A., 2002. Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 2002. Vol. 79, n° 2, p. 224-228. DOI 10.1002/bit.10280.

LE JOUBIOUX, Florian, HENDA, Yesmine Ben, BRIDIAU, Nicolas, ACHOUR, Oussama, GRABER, Marianne et MAUGARD, Thierry, 2013. The effect of substrate structure on the chemoselectivity of *Candida antarctica* lipase B-catalyzed acylation of amino-alcohols. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 janvier 2013. Vol. 85-86, p. 193-199. DOI 10.1016/j.molcatb.2012.09.006.

LEE, Jinhyuk, SUH, Se Won et SHIN, Seokmin, 2000. Computational Studies of Essential Dynamics of *Pseudomonas cepacia* Lipase. In : *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1 octobre 2000. Vol. 18, n° 2, p. 297-309. DOI 10.1080/07391102.2000.10506667.

LEE, Sang Hyun, DOAN, Thanh Thi Ngoc, WON, Keehoon, HA, Sung Ho et KOO, Yoon-Mo, 2010. Immobilization of lipase within carbon nanotube–silica composites for non-aqueous reaction systems. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 février 2010. Vol. 62, n° 2, p. 169-172. DOI 10.1016/j.molcatb.2009.10.004.

LEITNER, Walter, 2000. Designed to dissolve. In : *Nature*. mai 2000. Vol. 405, n° 6783, p. 129-130. DOI 10.1038/35012181.

LI, Lu, JI, Fangling, WANG, Jingyun, LI, Yachen et BAO, Yongming, 2015. Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 février 2015. Vol. 69, p. 46-53. DOI 10.1016/j.enzmictec.2014.12.003.

LI, Qingzhong, FAN, Fei, WANG, Yang, FENG, Wei et JI, Peijun, 2013. Enzyme Immobilization on Carboxyl-Functionalized Graphene Oxide for Catalysis in Organic Solvent. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 15 mai 2013. Vol. 52, n° 19, p. 6343-6348. DOI 10.1021/ie400558u.

LI, Quanhui, XIN, Jiaying, YAO, Tingting, WANG, Zhengyang et ZHENG, Luoyun, 2016. The Microwave-assisted Lipase-catalyzed Synthesis of Sucrose Laurate. In : CHANG, L., GUIRAN, C. et ZHEN, L. (éd.), *Proceedings of the International Conference on Electronics, Mechanics, Culture and Medicine*. Paris : Atlantis Press. p. 429-434. ISBN 978-94-6252-163-6.

LI, Ying, TANG, Zhao, JIN, Junsu et ZHANG, Zeting, 2013. Binary and ternary solubility of amino- and nitro-benzoic acids in supercritical carbon dioxide. In : *Fluid Phase Equilibria*. 25 avril 2013. Vol. 344, p. 71-78. DOI 10.1016/j.fluid.2013.01.021.

LIMA, Rafaely N., DOS ANJOS, Charlene S., OROZCO, Erika V. M. et PORTO, André L. M., 2019. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. In : *Molecular Catalysis*. 1 avril 2019. Vol. 466, p. 75-105. DOI 10.1016/j.mcat.2019.01.007.

LIN, Chaoping, XU, Kongliang, ZHENG, Renchao et ZHENG, Yuguo, 2019. Immobilization of amidase into a magnetic hierarchically porous metal–organic framework for efficient biocatalysis. In : *Chemical Communications*. 14 mai 2019. Vol. 55, n° 40, p. 5697-5700. DOI 10.1039/C9CC02038A.

LIN, Xiao-Sheng, WEN, Qing, HUANG, Ze-Lin, CAI, Yu-Zheng, HALLING, Peter J. et YANG, Zhen, 2015. Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology. In : *Process Biochemistry*. 1 novembre 2015. Vol. 50, n° 11, p. 1852-1858. DOI 10.1016/j.procbio.2015.07.019.

LIN, Yi-Han, XU, Jin-Ling, HU, Jianguo, WANG, Lian-Hui, ONG, Say Leong, LEADBETTER, Jared Renton et ZHANG, Lian-Hui, 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. In : *Molecular Microbiology*. 2003. Vol. 47, n° 3, p. 849-860. DOI 10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x.

LINDNER, Holger A., LUNIN, Vladimir V., ALARY, Alain, HECKER, Regina, CYGLER, Mirosław et MÉNARD, Robert, 2003. Essential Roles of Zinc Ligation and Enzyme Dimerization for Catalysis in the Aminoacylase-1/M20 Family. In : *Journal of Biological Chemistry*. 11 juillet 2003. Vol. 278, n° 45, p. 44496-44504. DOI 10.1074/jbc.M304233200.

LIU, Dong-Mei et DONG, Chen, 2020. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. In : *Process Biochemistry*. 1 mai 2020. Vol. 92, p. 464-475. DOI 10.1016/j.procbio.2020.02.005.

LIU, Kuan-Ju, LIU, Kuan-Miao et CHANG, Hung-Min, 2007. Biocatalytic synthesis of palmitoyl vanillylamide in supercritical carbon dioxide through amidation of vanillylamine hydrochloride and palmitic anhydride by lipase. In : *Food Chemistry*. 1 janvier 2007. Vol. 102, n° 4, p. 1020-1026. DOI 10.1016/j.foodchem.2006.06.045.

LODOLA, Alessio, BRANDUARDI, Davide, DE VIVO, Marco, CAPOFERRI, Luigi, MOR, Marco, PIOMELLI, Daniele et CAVALLI, Andrea, 2012. A Catalytic Mechanism for Cysteine N-Terminal Nucleophile Hydrolases, as Revealed by Free Energy Simulations. In : *PLoS ONE* [en ligne]. 28 février 2012. Vol. 7, n° 2. [Consulté le 8 octobre 2019]. DOI 10.1371/journal.pone.0032397. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3289653/>.

LOOTS, Du Toit, ERASMUS, Elardus et MIENIE, Lodewyk J., 2005. Identification of 19 New Metabolites Induced by Abnormal Amino Acid Conjugation in Isovaleric Acidemia. In : *Clinical Chemistry*. 1 août 2005. Vol. 51, n° 8, p. 1510-1512. DOI 10.1373/clinchem.2005.048421.

LÓPEZ-GALLEGO, Fernando, GUISÁN, Jose M. et BETANCOR, Lorena, 2013. Glutaraldehyde-Mediated Protein Immobilization. In : GUISAN, Jose M. (éd.), *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition* [en ligne]. Totowa, NJ : Humana Press. Methods in Molecular Biology. p. 33-41. [Consulté le 29 juin 2020]. ISBN 978-1-62703-550-7. Disponible à l'adresse : [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_3).

LORTIE, Robert, 1997. Enzyme catalyzed esterification. In : *Biotechnology Advances*. 1 janvier 1997. Vol. 15, n° 1, p. 1-15. DOI 10.1016/S0734-9750(96)00046-8.

LOU, Xianwen, SHENG, Yufen et ZHOU, Liangmo, 1990. Investigation of parameters in the separation of amino acid enantiomers by supercritical fluid chromatography. In : *Journal of Chromatography A*. 1 janvier 1990. Vol. 514, p. 253-257. DOI 10.1016/S0021-9673(01)89396-1.

LOZANO, Pedro, 2010a. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. In : *Green Chemistry*. 6 avril 2010. Vol. 12, n° 4, p. 555-569. DOI 10.1039/B919088K.

LOZANO, Pedro, ALVAREZ, Elena, BERNAL, Juana M., NIETO, Susana, GOMEZ, Celia et SANCHEZ-GOMEZ, Gregorio, 2017. Ionic Liquids for Clean Biocatalytic Processes. In : *Current Green Chemistry*. 2017. Vol. 4, n° 3, p. 116-129. DOI 10.2174/2213346104666171115160413.

LOZANO, Pedro, ALVAREZ, Elena, NIETO, Susana, VILLA, Rocio, BERNAL, Juana M. et DONAIRE, Antonio, 2019. Biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters in ionic liquids and deep eutectic solvents. In : *Green Chemistry*. 17 juin 2019. Vol. 21, n° 12, p. 3353-3361. DOI 10.1039/C9GC01076A.

LOZANO, Pedro, BERNAL, Juana M. et VAULTIER, Michel, 2011. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. In : *Fuel*. 1 novembre 2011. Vol. 90, n° 11, p. 3461-3467. DOI 10.1016/j.fuel.2011.06.008.

LOZANO, Pedro, DE DIEGO, Teresa, SAUER, Tanja, VAULTIER, Michel, GMOUH, Said et IBORRA, José L., 2007. On the importance of the supporting material for activity of

immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 février 2007. Vol. 40, n° 1, p. 93-100. DOI 10.1016/j.supflu.2006.03.025.

LOZANO, Pedro, GOMEZ, Celia, NIETO, Susana, SANCHEZ-GOMEZ, Gregorio, GARCÍA-VERDUGO, Eduardo et LUIS, Santiago V., 2017. Highly selective biocatalytic synthesis of monoacylglycerides in sponge-like ionic liquids. In : *Green Chemistry*. 23 janvier 2017. Vol. 19, n° 2, p. 390-396. DOI 10.1039/C6GC01969B.

LU, Chung-Dar, 2006. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 avril 2006. Vol. 70, n° 3, p. 261-272. DOI 10.1007/s00253-005-0308-z.

LU, Shan, SONG, Zhihong et HE, Jing, 2011. Diffusion-Controlled Protein Adsorption in Mesoporous Silica. In : *The Journal of Physical Chemistry B*. 23 juin 2011. Vol. 115, n° 24, p. 7744-7750. DOI 10.1021/jp200778b.

MACHADO, Juliana Ribeiro, PEREIRA, Gabriela Nayana, DOS SANTOS DE OLIVEIRA, Priscilla, ZENEVICZ, Mara Cristina, LERIN, Lindomar, DOS REIS BARRETO DE OLIVEIRA, Rafael, CABRAL DE HOLANDA CAVALCANTI, Sócrates, NINOW, Jorge Luiz et DE OLIVEIRA, Débora, 2017. Synthesis of eugenyl acetate by immobilized lipase in a packed bed reactor and evaluation of its larvicidal activity. In : *Process Biochemistry*. 1 juillet 2017. Vol. 58, p. 114-119. DOI 10.1016/j.procbio.2017.04.031.

MACHSUN, Achmadin Luthfi, GOZAN, Misri, NASIKIN, Mohammad, SETYAHADI, Siswa et YOO, Young Je, 2010. Membrane microreactor in biocatalytic transesterification of triolein for biodiesel production. In : *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 1 décembre 2010. Vol. 15, n° 6, p. 911-916. DOI 10.1007/s12257-010-0151-7.

MADEIRA LAU, R., VAN RANTWIJK, F., SEDDON, K. R. et SHELDON, R. A., 2000. Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids. In : *Organic Letters*. 1 décembre 2000. Vol. 2, n° 26, p. 4189-4191. DOI 10.1021/ol006732d.

MALLIN, Hendrik, MUSCHIOL, Jan, BYSTRÖM, Emil et BORNSCHEUER, Uwe T., 2013. Efficient Biocatalysis with Immobilized Enzymes or Encapsulated Whole Cell Microorganism by Using the SpinChem Reactor System. In : *ChemCatChem*. décembre 2013. Vol. 5, n° 12, p. 3529-3532. DOI 10.1002/cctc.201300599.

MANGODT, Evelyne A., DENDOOVEN, Ella, DE FRÉ, Charlotte, LAMBERT, Julien et AERTS, Olivier, 2019. Capryloyl glycine: A polyfunctional cosmetic ingredient and potential skin sensitizer. In : *Contact Dermatitis*. 1 juin 2019. Vol. 80, n° 6, p. 400-402. DOI 10.1111/cod.13215.

MANOVA, Daniela, GALLIER, Florian, TAK-TAK, Lotfi, YOTAVA, Lyubov et LUBIN-GERMAIN, Nadège, 2018. Lipase-catalyzed amidation of carboxylic acid and amines. In : *Tetrahedron Letters*. 23 mai 2018. Vol. 59, n° 21, p. 2086-2090. DOI 10.1016/j.tetlet.2018.04.049.

MARCHANT, Roger et BANAT, Ibrahim M., 2012. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? In : *Biotechnology Letters*. 1 septembre 2012. Vol. 34, n° 9, p. 1597-1605. DOI 10.1007/s10529-012-0956-x.

MARIA CHONG, A. S. et ZHAO, X. S., 2004. Functionalized nanoporous silicas for the immobilization of penicillin acylase. In : *Applied Surface Science*. 15 octobre 2004. Vol. 237, n° 1, p. 398-404. DOI 10.1016/j.apsusc.2004.06.080.

- MARINI, Guillermo, LUCHESE, Mateus Dalcin, ARGONDIZZO, Ana Paula Correa, DE GÓES, Ana Carolina Magalhães Andrade, GALLER, Ricardo, ALVES, Tito Lívio Moitinho, MEDEIROS, Marco Alberto et LARENTIS, Ariane Leites, 2014. Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process. In : *BMC Biotechnology*. 9 janvier 2014. Vol. 14, n° 1, p. 1. DOI 10.1186/1472-6750-14-1.
- MARQUES, M. P. C., FERNANDES, P., CABRAL, J. M. S., ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P. et PLAZL, I., 2010. On the feasibility of in situ steroid biotransformation and product recovery in microchannels. In : *Chemical Engineering Journal*. 1 juin 2010. Vol. 160, n° 2, p. 708-714. DOI 10.1016/j.cej.2010.03.056.
- MARTENS, Marc, COTTENIE-RUYSSCHAERT, Micheline, HANSELAER, René, COOMAN, Luc De, CASTEELE, Karel Vande et VAN SUMERE, Christiaan F., 1988b. Characteristics and specificity of purified n-feruloylglycine amidohydrolase from isolated barley embryos. In : *Phytochemistry*. 1988b. Vol. 27, n° 8, p. 2465-2475. DOI 10.1016/0031-9422(88)87013-4.
- MARTENS, Marc, COTTENIE-RUYSSCHAERT, Micheline, HANSELAER, René, COOMAN, Luc De, CASTEELE, Karel Vande et VAN SUMERE, Christiaan F., 1988a. N-Feruloylglycine amidohydrolase from barley seeds and isolated barley embryos. In : *Phytochemistry*. 1988a. Vol. 27, n° 8, p. 2457-2463. DOI 10.1016/0031-9422(88)87012-2.
- MARTINELLE, M., HOLMQUIST, M. et HULT, K., 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. In : *Biochimica Et Biophysica Acta*. 5 octobre 1995. Vol. 1258, n° 3, p. 272-276. DOI 10.1016/0005-2760(95)00131-u.
- MARTY, Alain et CONDORET, Jean-Stéphane, 2001. Enzymatic Transformations in Supercritical Fluids. In : VULFSON, Evgeny N., HALLING, Peter J. et HOLLAND, Herbert L. (éd.), *Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols* [en ligne]. Totowa, NJ : Humana Press. Methods in Biotechnology. p. 587-602. [Consulté le 21 juin 2020]. ISBN 978-1-59259-112-1. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.1385/1-59259-112-4:587>.
- MASE, Nobuyuki, SAKO, Takeshi, HORIKAWA, Yoshiteru et TAKABE, Kunihiro, 2003. Novel strategic lipase-catalyzed asymmetrization of 1,3-propanediacetate in supercritical carbon dioxide. In : *Tetrahedron Letters*. 7 juillet 2003. Vol. 44, n° 28, p. 5175-5178. DOI 10.1016/S0040-4039(03)01266-8.
- MATEO, Cesar, ABIAN, Olga, FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto et GUIBAN, Jose M., 2000. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment☆. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 avril 2000. Vol. 26, n° 7, p. 509-515. DOI 10.1016/S0141-0229(99)00188-X.
- MATSUDA, Tomoko, 2013a. Recent progress in biocatalysis using supercritical carbon dioxide. In : *Journal of Bioscience and Bioengineering*. mars 2013. Vol. 115, n° 3, p. 233-241. DOI 10.1016/j.jbiosc.2012.10.002.
- MATSUDA, Tomoko, KANAMARU, Ryuzo, WATANABE, Kazunori, KAMITANAKA, Takashi, HARADA, Tadao et NAKAMURA, Kaoru, 2003. Control of enantioselectivity of lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide by tuning the pressure and temperature. In : *Tetrahedron: Asymmetry*. 18 juillet 2003. Vol. 14, n° 14, p. 2087-2091. DOI 10.1016/S0957-4166(03)00431-2.



MATZKE, Marianne, STOLTE, Stefan, THIELE, Karen, JUFFERNHOLZ, Tanja, ARNING, Jürgen, RANKE, Johannes, WELZ-BIERMANN, Urs et JASTORFF, Bernd, 2007. The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. In : *Green Chemistry*. 30 octobre 2007. Vol. 9, n° 11, p. 1198-1207. DOI 10.1039/B705795D.

MAUGARD, Thierry, REMAUD-SIMEON, Magali et MONSAN, Pierre, 1998. Kinetic study of chemoselective acylation of amino-alditol by immobilized lipase in organic solvent: effect of substrate ionization. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 8 septembre 1998. Vol. 1387, n° 1, p. 177-183. DOI 10.1016/S0167-4838(98)00119-8.

MAUGARD, Thierry, REMAUD-SIMEON, Magali, PETRE, Dominique et MONSAN, Pierre, 1997. Lipase-catalyzed chemoselective n-acylation of amino-sugar derivatives in hydrophobic solvent: Acid-amine ion-pair effects. In : *Tetrahedron*. 2 juin 1997. Vol. 53, n° 22, p. 7587-7594. DOI 10.1016/S0040-4020(97)00450-X.

MCCUE, Jeffrey M., DRISCOLL, William J. et MUELLER, Gregory P., 2008. Cytochrome c catalyzes the in vitro synthesis of arachidonoyl glycine. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 11 janvier 2008. Vol. 365, n° 2, p. 322-327. DOI 10.1016/j.bbrc.2007.10.175.

MEI, Ying, MILLER, Lisa, GAO, Wei et GROSS, Richard A., 2003. Imaging the Distribution and Secondary Structure of Immobilized Enzymes Using Infrared Microspectroscopy. In : *Biomacromolecules*. 1 janvier 2003. Vol. 4, n° 1, p. 70-74. DOI 10.1021/bm025611t.

MELGOSA, Rodrigo, SANZ, M. Teresa, G. SOLAESA, Ángela, BUCIO, Silvia Liliana et BELTRÁN, Sagrario, 2015. Enzymatic activity and conformational and morphological studies of four commercial lipases treated with supercritical carbon dioxide. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 février 2015. Vol. 97, p. 51-62. DOI 10.1016/j.supflu.2014.11.003.

MENA-GARCÍA, A., RUIZ-MATUTE, A. I., SORIA, A. C. et SANZ, M. L., 2019. Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. In : *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 octobre 2019. Vol. 119, p. 115612. DOI 10.1016/j.trac.2019.07.023.

MÉNDEZ-SANTIAGO, Janette et TEJA, Aryn S, 1999. The solubility of solids in supercritical fluids. In : *Fluid Phase Equilibria*. 1 juin 1999. Vol. 158-160, p. 501-510. DOI 10.1016/S0378-3812(99)00154-5.

MESTROM, Luuk, CLAESSEN, Jord G. R. et HANEFELD, Ulf, 2019. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Esters in Water. In : *ChemCatChem*. 2019. Vol. 11, n° 7, p. 2004-2010. DOI 10.1002/cctc.201801991.

MIELKE, Eric, PLOUFFE, Patrick, MONGEON, Sébastien S., AELLIG, Christof, FILLIGER, Sarah, MACCHI, Arturo et ROBERGE, Dominique M., 2018. Micro-reactor mixing unit interspacing for fast liquid-liquid reactions leading to a generalized scale-up methodology. In : *Chemical Engineering Journal*. 15 novembre 2018. Vol. 352, p. 682-694. DOI 10.1016/j.cej.2018.07.043.

MIGUEZ, João P., GAMA, Rafaela S., BOLINA, Iara C. A., DE MELO, Cristiane C., CORDEIRO, Marcia R., HIRATA, Daniela B. et MENDES, Adriano A., 2018. Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. In : *Chemical*

*Engineering Research and Design*. 1 novembre 2018. Vol. 139, p. 296-308. DOI 10.1016/j.cherd.2018.09.037.

MILMAN, Garry, MAOR, Yehoshua, ABU-LAFI, Saleh, HOROWITZ, Michal, GALLILY, Ruth, BATKAI, Sandor, MO, Fong-Ming, OFFERTALER, Laszlo, PACHER, Pal, KUNOS, George et MECHOULAM, Raphael, 2006. N-arachidonoyl l-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 14 février 2006. Vol. 103, n° 7, p. 2428-2433. DOI 10.1073/pnas.0510676103.

MIYAKE, M., INNAMI, T. et KAKIMOTO, Y., 1983. A beta-citryl-L-glutamate-hydrolysing enzyme in rat testes. In : *Biochimica Et Biophysica Acta*. 18 octobre 1983. Vol. 760, n° 2, p. 206-214. DOI 10.1016/0304-4165(83)90165-4.

MONHEMI, Hassan et HOUSAINDOKHT, Mohammad Reza, 2012. How enzymes can remain active and stable in a compressed gas? New insights into the conformational stability of *Candida antarctica* lipase B in near-critical propane. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 décembre 2012. Vol. 72, p. 161-167. DOI 10.1016/j.supflu.2012.08.020.

MONHEMI, Hassan, HOUSAINDOKHT, Mohammad Reza, MOOSAVI-MOVAHEDI, Ali Akbar et BOZORGMEHR, Mohammad Reza, 2014. How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea : choline chloride deep eutectic solvent. In : *Physical Chemistry Chemical Physics*. 25 juin 2014. Vol. 16, n° 28, p. 14882-14893. DOI 10.1039/C4CP00503A.

MONTET, D., SERVAT, F., PINA, M., GRAILLE, J., GALZY, P., ARNAUD, A., LEDON, H. et MARCOU, L., 1990. Enzymatic synthesis of N- $\epsilon$ -acyllysines. In : *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1990. Vol. 67, n° 11, p. 771-774. DOI 10.1007/BF02540489.

MONTI, D., CARREA, G., RIVA, S., BALDARO, E. et FRARE, G., 2000. Characterization of an industrial biocatalyst: immobilized glutaryl-7-ACA acylase. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 20 octobre 2000. Vol. 70, n° 2, p. 239-244. DOI 10.1002/1097-0290(20001020)70:2<239::aid-bit13>3.0.co;2-i.

MORA-PALE, J. Mauricio, PÉREZ-MUNGUÍA, Sandra, GONZÁLEZ-MEJÍA, Jessica C., DORDICK, Jonathan S. et BÁRZANA, Eduardo, 2007. The lipase-catalyzed hydrolysis of lutein diesters in non-aqueous media is favored at extremely low water activities. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 2007. Vol. 98, n° 3, p. 535-542. DOI 10.1002/bit.21417.

MORIGUCHI, Mitsuaki, SAKAI, Kenji, KATSUNO, Yutaka, MAKI, Tetsuyoshi et WAKAYAMA, Mamoru, 1993. Purification and Characterization of Novel N-Acyl-D-aspartate Amidohydrolase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6. In : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1 janvier 1993. Vol. 57, n° 7, p. 1145-1148. DOI 10.1271/bbb.57.1145.

MUEGGE, Ingo et MARTIN, Yvonne C., 1999. A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach. In : *Journal of Medicinal Chemistry*. 1 mars 1999. Vol. 42, n° 5, p. 791-804. DOI 10.1021/jm980536j.

MUELLER, Gregory P. et DRISCOLL, William J., 2007. In Vitro Synthesis of Oleoylglycine by Cytochrome c Points to a Novel Pathway for the Production of Lipid Signaling Molecules. In : *Journal of Biological Chemistry*. 8 mars 2007. Vol. 282, n° 31, p. 22364-22369. DOI 10.1074/jbc.M701801200.

MUGO, Samuel M. et AYTUN, Karl, 2010. Lipase immobilized microstructured fiber based flow-through microreactor for facile lipid transformations. In : *Journal of Molecular Catalysis*

*B: Enzymatic*. 1 décembre 2010. Vol. 67, n° 3, p. 202-207. DOI 10.1016/j.molcatb.2010.08.006.

MUKHERJI, Ruchira, VARSHNEY, Nishant Kumar, PANIGRAHI, Priyabrata, SURESH, C. G. et PRABHUNE, Asmita, 2014. A new role for penicillin acylases: Degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 5 mars 2014. Vol. 56, p. 1-7. DOI 10.1016/j.enzmictec.2013.12.010.

NAKANISHI, Kazuhiro, IMAMURA, Koreyoshi, IMANAKA, Hiroyuki, KOREISHI, Mayuko et NIO, Noriki, 2011. N $\epsilon$ -acyl-L-lysine-specific aminoacylase [en ligne]. US7888079B2. 15 février 2011. [Consulté le 25 octobre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://patents.google.com/patent/US7888079B2/en>. US11/842,457

NAKAYA, Hideki, MIYAWAKI, Osato et NAKAMURA, Kozo, 2001. Determination of log P for pressurized carbon dioxide and its characterization as a medium for enzyme reaction. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 février 2001. Vol. 28, n° 2, p. 176-182. DOI 10.1016/S0141-0229(00)00314-8.

NARWAL, Sunil Kumar et GUPTA, Reena, 2013. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. In : *Biotechnology Letters*. 1 avril 2013. Vol. 35, n° 4, p. 479-490. DOI 10.1007/s10529-012-1116-z.

NEEDHAM, Te, PARUTA, An et GERRAUGHTY, Rj, 1971. Solubility of Amino Acids in Pure Solvent Systems. In : *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1971. Vol. 60, n° 4, p. 565- +. DOI 10.1002/jps.2600600410.

NETA, Nair S., TEIXEIRA, José A. et RODRIGUES, Lígia R., 2015. Sugar Ester Surfactants: Enzymatic Synthesis and Applications in Food Industry. In : *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 16 avril 2015. Vol. 55, n° 5, p. 595-610. DOI 10.1080/10408398.2012.667461.

NEWMAN, Debra, ABULADZE, Natalia, SCHOLZ, Karoline, DEKANT, Wolfgang, TSUPRUN, Vladimir, RYAZANTSEV, Sergey, BONDAR, Galyna, SASSANI, Pakan, KURTZ, Ira et PUSHKIN, Alexander, 2007. Specificity of Aminoacylase III-Mediated Deacetylation of Mercapturic Acids. In : *Drug Metabolism and Disposition*. 1 janvier 2007. Vol. 35, n° 1, p. 43-50. DOI 10.1124/dmd.106.012062.

NGUYEN, Hoang Chinh, HUONG, Dinh Thi My, JUAN, Horng-Yi, SU, Chia-Hung et CHIEN, Chien-Chung, 2018. Liquid Lipase-Catalyzed Esterification of Oleic Acid with Methanol for Biodiesel Production in the Presence of Superabsorbent Polymer: Optimization by Using Response Surface Methodology. In : *Energies*. mai 2018. Vol. 11, n° 5, p. 1085. DOI 10.3390/en11051085.

NIEMEYER, Emily D. et BRIGHT, Frank V., 1998. The pH within PFPE Reverse Micelles Formed in Supercritical CO<sub>2</sub>. In : *The Journal of Physical Chemistry B*. 1 février 1998. Vol. 102, n° 8, p. 1474-1478. DOI 10.1021/jp973157v.

NIEVES-REMACHA, María José, KULKARNI, Amol A. et JENSEN, Klavs F., 2012. Hydrodynamics of Liquid-Liquid Dispersion in an Advanced-Flow Reactor. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 19 décembre 2012. Vol. 51, n° 50, p. 16251-16262. DOI 10.1021/ie301821k.

NOGUEIRA, D. R., MITJANS, M., INFANTE, M. R. et VINARDELL, M. P., 2011. The role of counterions in the membrane-disruptive properties of pH-sensitive lysine-based surfactants.

In : *Acta Biomaterialia*. 1 juillet 2011. Vol. 7, n° 7, p. 2846-2856. DOI 10.1016/j.actbio.2011.03.017.

NORAIDA, Siti, RAHIM, Abd, SULAIMAN, Alawi, HALIM, Ku Bulat Ku, HAMID, Ku Halim Ku, EDAMA, Nurul Aini et SAMSU, Azhari, 2015. Effect of Agitation Speed for Enzymatic Hydrolysis of Tapioca Slurry Using Encapsulated Enzymes in an Enzyme Bioreactor. In : . 2015. DOI 10.7763/IJCEA.2015.V6.447.

NOVAK, Uros, LAVRIC, Daniela et ZNIDARSIC-PLAZL, Polona, 2016. Continuous Lipase B-Catalyzed Isoamyl Acetate Synthesis in a Two-Liquid Phase System Using Corning (R) AFR (TM) Module Coupled with a Membrane Separator Enabling Biocatalyst Recycle. In : *Journal of Flow Chemistry*. mars 2016. Vol. 6, n° 1, p. 33-38. DOI 10.1556/1846.2015.00038.

NYARI, Nádia Ligianara Dewes, ZABOT, Giovani Leone, ZAMADEI, Raquel, PALUZZI, Alessandro Rogerio, TRES, Marcus Vinícius, ZENI, Jamile, VENQUIARUTO, Luciana Dornelles et DALLAGO, Rogério Marcos, 2018. Activation of *Candida antarctica* lipase B in pressurized fluids for the synthesis of esters. In : *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2018. Vol. 93, n° 3, p. 897-908. DOI 10.1002/jctb.5447.

OLIVEIRA, A. C. et ROSA, M. F., 2006. Enzymatic transesterification of sunflower oil in an aqueous-oil biphasic system. In : *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1 janvier 2006. Vol. 83, n° 1, p. 21-25. DOI 10.1007/s11746-006-1170-6.

OLIVEIRA, D., FEHRMANN, A. C., RUBIRA, A. F., KUNITA, M. H., DARIVA, C. et OLIVEIRA, J. Vladimir, 2006. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 octobre 2006. Vol. 38, n° 3, p. 373-382. DOI 10.1016/j.supflu.2005.12.007.

OLIVEIRA, Maria V. S., VIDAL, Bruna T., MELO, Claudia M., DE MIRANDA, Rita de C. M., SOARES, Cleide M. F., COUTINHO, João A. P., VENTURA, Sónia P. M., MATTEDI, Silvana et LIMA, Álvaro S., 2016. (Eco)toxicity and biodegradability of protic ionic liquids. In : *Chemosphere*. 1 mars 2016. Vol. 147, p. 460-466. DOI 10.1016/j.chemosphere.2015.11.016.

OLIVIER-BOURBIGOU, H., MAGNA, L. et MORVAN, D., 2010. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. In : *Applied Catalysis A: General*. 31 janvier 2010. Vol. 373, n° 1, p. 1-56. DOI 10.1016/j.apcata.2009.10.008.

OTTE, Konrad B et HAUER, Bernhard, 2015. Enzyme engineering in the context of novel pathways and products. In : *Current Opinion in Biotechnology*. 1 décembre 2015. Vol. 35, p. 16-22. DOI 10.1016/j.copbio.2014.12.011.

PAIK, W. K., BLOCH-FRANKENTHAL, Leah, BIRNBAUM, Sanford M., WINITZ, Milton et GREENSTEIN, Jesse P., 1957.  $\epsilon$ -Lysine acylase. In : *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1 janvier 1957. Vol. 69, p. 56-66. DOI 10.1016/0003-9861(57)90472-1.

PALUDO, Natalia, ALVES, Joana S., ALTMANN, Cintia, AYUB, Marco A. Z., FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto et RODRIGUES, Rafael C., 2015. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. In : *Ultrasonics Sonochemistry*. 1 janvier 2015. Vol. 22, p. 89-94. DOI 10.1016/j.ultsonch.2014.05.004.

PANDEY, Deepshikha, DAVEREY, Achlesh et ARUNACHALAM, Kusum, 2020. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. In : *Journal of Cleaner Production*. 10 mai 2020. Vol. 255, p. 120267. DOI 10.1016/j.jclepro.2020.120267.

- PAPADOPOULOU, Athena A., KATSOURA, Maria H., CHATZIKONSTANTINO, Alexandra, KYRIAKOU, Eleni, POLYDERA, Angeliki C., TZAKOS, Andreas G. et STAMATIS, Haralambos, 2013. Enzymatic hybridization of  $\alpha$ -lipoic acid with bioactive compounds in ionic solvents. In : *Bioresource Technology*. 1 mai 2013. Vol. 136, p. 41-48. DOI 10.1016/j.biortech.2013.02.067.
- PÂRVULESCU, Vasile I. et HARDACRE, Christopher, 2007. Catalysis in Ionic Liquids. In : *Chemical Reviews*. 1 juin 2007. Vol. 107, n° 6, p. 2615-2665. DOI 10.1021/cr050948h.
- PÄTZOLD, Magdalena, SIEBENHALLER, Sascha, KARA, Selin, LIESE, Andreas, SYLDATK, Christoph et HOLTSMANN, Dirk, 2019. Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. In : *Trends in Biotechnology*. 1 septembre 2019. Vol. 37, n° 9, p. 943-959. DOI 10.1016/j.tibtech.2019.03.007.
- PAVLIDIS, I. V., TSOUFIS, T., ENOTIADIS, A., GOURNIS, D. et STAMATIS, H., 2010a. Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes for Lipase Immobilization. In : *Advanced Engineering Materials*. 2010. Vol. 12, n° 5, p. B179-B183. DOI 10.1002/adem.200980021.
- PAYNE, Samantha M. et KERTON, Francesca M., 2010. Solubility of bio-sourced feedstocks in 'green' solvents. In : *Green Chemistry*. 3 septembre 2010. Vol. 12, n° 9, p. 1648-1653. DOI 10.1039/C0GC00205D.
- PEDERSEN, Ninfa R, WIMMER, Reinhard, EMMERSEN, Jeppe, DEGN, Peter et PEDERSEN, Lars H, 2002. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. In : *Carbohydrate Research*. 16 juillet 2002. Vol. 337, n° 13, p. 1179-1184. DOI 10.1016/S0008-6215(02)00112-X.
- PENG, Yi-Kang, SUN, Long-Long, SHI, Wei et LONG, Jia-Jie, 2016. Investigation of enzymatic activity, stability and structure changes of pectinase treated in supercritical carbon dioxide. In : *Journal of Cleaner Production*. 1 juillet 2016. Vol. 125, p. 331-340. DOI 10.1016/j.jclepro.2016.03.058.
- PERDOMO, Igor Chiarelli, GIANOLIO, Stefania, PINTO, Andrea, ROMANO, Diego, CONTENTE, Martina Letizia, PARADISI, Francesca et MOLINARI, Francesco, 2019. Efficient Enzymatic Preparation of Flavor Esters in Water. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 12 juin 2019. Vol. 67, n° 23, p. 6517-6522. DOI 10.1021/acs.jafc.9b01790.
- PERES, Céilia, GOMES DA SILVA, Marco D. R. et BARREIROS, Susana, 2003. Water Activity Effects on Geranyl Acetate Synthesis Catalyzed by Novozym in Supercritical Ethane and in Supercritical Carbon Dioxide. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 mars 2003. Vol. 51, n° 7, p. 1884-1888. DOI 10.1021/jf026071u.
- PÉREZ, Lourdes, PINAZO, Aurora, TERESA GARCÍA, M., LOZANO, Marina, MANRESA, Angeles, ANGELET, Marta, PILAR VINARDELL, M., MITJANS, Montse, PONS, Ramon et ROSA INFANTE, M., 2009. Cationic surfactants from lysine: Synthesis, micellization and biological evaluation. In : *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1 mai 2009. Vol. 44, n° 5, p. 1884-1892. DOI 10.1016/j.ejmech.2008.11.003.
- PÉREZ, Noemí, PÉREZ, Lourdes, INFANTE, M. Rosa et GARCÍA, M. Teresa, 2005. Biological properties of arginine-based glycerolipidic cationic surfactants. In : *Green Chemistry*. 22 juin 2005. Vol. 7, n° 7, p. 540-546. DOI 10.1039/B419204D.
- PETERS, G. H. et BYWATER, R. P., 1999. Computational analysis of chain flexibility and fluctuations in Rhizomucor miehei lipase. In : *Protein Engineering*. septembre 1999. Vol. 12, n° 9, p. 747-754. DOI 10.1093/protein/12.9.747.

- PETERS, G. H., SVENDSEN, A., LANGBERG, H., VIND, J., PATKAR, S. A., TOXVAERD, S. et KINNUNEN, P. K. J., 1998. Active Serine Involved in the Stabilization of the Active Site Loop in the *Humicola lanuginosa* Lipase. In : *Biochemistry*. 1 septembre 1998. Vol. 37, n° 36, p. 12375-12383. DOI 10.1021/bi9728831.
- PETERS, G. H., VANAALTEN, D. M. F., SVENDSEN, A. et BYWATER, R., 1997. Essential dynamics of lipase binding sites: The effect of inhibitors of different chain length. In : *Protein Engineering*. février 1997. Vol. 10, n° 2, p. 149-158. DOI 10.1093/protein/10.2.149.
- PIERA, E., INFANTE, M. R. et CLAPÉS, P., 2000. Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 5 novembre 2000. Vol. 70, n° 3, p. 323-331.
- PINAZO, A., MANRESA, M. A., MARQUES, A. M., BUSTELO, M., ESPUNY, M. J. et PÉREZ, L., 2016. Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. In : *Advances in Colloid and Interface Science*. 1 février 2016. Vol. 228, p. 17-39. DOI 10.1016/j.cis.2015.11.007.
- PINAZO, Aurora, PONS, Ramon, BUSTELO, Marta, MANRESA, María Ángeles, MORÁN, Carmen, RALUY, Miriam et PÉREZ, Lourdes, 2019. Gemini histidine based surfactants: Characterization; surface properties and biological activity. In : *Journal of Molecular Liquids*. 1 septembre 2019. Vol. 289, p. 111156. DOI 10.1016/j.molliq.2019.111156.
- PITZER, Julia et STEINER, Kerstin, 2016. Amides in Nature and Biocatalysis. In : *Journal of Biotechnology*. 10 octobre 2016. Vol. 235, p. 32-46. DOI 10.1016/j.jbiotec.2016.03.023.
- PLEISS, Jürgen, FISCHER, Markus et SCHMID, Rolf D, 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. In : *Chemistry and Physics of Lipids*. 1 juin 1998. Vol. 93, n° 1, p. 67-80. DOI 10.1016/S0009-3084(98)00030-9.
- POHAR, Andrej, PLAZL, Igor et ŽNIDARŠIČ-PLAZL, Polona, 2009. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n-heptane two-phase system at the microreactor scale. In : *Lab on a Chip*. 7 décembre 2009. Vol. 9, n° 23, p. 3385-3390. DOI 10.1039/B915151F.
- POTDAR, Mahesh K., KELSO, Geoffrey F., SCHWARZ, Lachlan, ZHANG, Chunfang et HEARN, Milton T. W., 2015. Recent Developments in Chemical Synthesis with Biocatalysts in Ionic Liquids. In : *Molecules*. septembre 2015. Vol. 20, n° 9, p. 16788-16816. DOI 10.3390/molecules200916788.
- PRINZ, William A., ÅSLUND, Fredrik, HOLMGREN, Arne et BECKWITH, Jon, 1997. The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. In : *Journal of Biological Chemistry*. 20 juin 1997. Vol. 272, n° 25, p. 15661-15667. DOI 10.1074/jbc.272.25.15661.
- PRLAINOVIĆ, Nevena Ž, BEZBRADICA, Dejan I., KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Zorica D., MARINKOVIĆ, Aleksandar D. et MIJIN, Dušan Ž, 2011. Immobilization of enzymes onto carbon nanotubes. In : *Hemjska industrija*. 2011. Vol. 65, n° 4, p. 423-430.
- PUSHKIN, Alexander, CARPENITO, Gerardo, ABULADZE, Natalia, NEWMAN, Debra, TSUPRUN, Vladimir, RYAZANTSEV, Sergey, MOTEMOTURU, Srilakshmi, SASSANI, Pakan, SOLOVIEVA, Nadezhda, DUKKIPATI, Ramnath et KURTZ, Ira, 2004. Structural characterization, tissue distribution, and functional expression of murine aminoacylase III. In : *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1 avril 2004. Vol. 286, n° 4, p. C848-C856. DOI 10.1152/ajpcell.00192.2003.

- QURESHI, Ziyauddin S., DESHMUKH, Krishna M. et BHANAGE, Bhalchandra M., 2014. Applications of ionic liquids in organic synthesis and catalysis. In : *Clean Technologies and Environmental Policy*. 1 décembre 2014. Vol. 16, n° 8, p. 1487-1513. DOI 10.1007/s10098-013-0660-0.
- RADHAKRISHNA, Mithun, GRIMALDI, Joseph, BELFORT, Georges et KUMAR, Sanat K., 2013. Stability of Proteins Inside a Hydrophobic Cavity. In : *Langmuir*. 16 juillet 2013. Vol. 29, n° 28, p. 8922-8928. DOI 10.1021/la4014784.
- RAFFAINI, Giuseppina et GANAZZOLI, Fabio, 2010. Protein adsorption on biomaterial and nanomaterial surfaces: a molecular modeling approach to study non-covalent interactions. In : *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*. décembre 2010. Vol. 8, n° 3, p. 135-145. DOI 10.5301/JABB.2010.6093.
- RAFFAINI, Giuseppina et GANAZZOLI, Fabio, 2012. Molecular modelling of protein adsorption on the surface of titanium dioxide polymorphs. In : *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 28 mars 2012. Vol. 370, n° 1963, p. 1444-1462. DOI 10.1098/rsta.2011.0266.
- RAGHAVENDRA, Tripti, BASAK, Arpana, MANOCHA, Lalit M., SHAH, Amita R. et MADAMWAR, Datta, 2013. Robust nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B – Multiwalled carbon nanotubes: Characterization and application for multiple usages in non-aqueous biocatalysis. In : *Bioresource Technology*. 1 juillet 2013. Vol. 140, p. 103-110. DOI 10.1016/j.biortech.2013.04.071.
- RAJU, Rajala V.S., DATLA, Raju S.S., MOYANA, Terence N., KAKKAR, Rakesh, CARLSEN, Svein A. et SHARMA, Rajendra K., 2000. N-myristoyltransferase. In : *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1 janvier 2000. Vol. 204, n° 1, p. 135-155. DOI 10.1023/A:1007012622030.
- RAO, Shashidhar N., HEAD, Martha S., KULKARNI, Amit et LALONDE, Judith M., 2007. Validation Studies of the Site-Directed Docking Program LibDock. In : *Journal of Chemical Information and Modeling*. 1 novembre 2007. Vol. 47, n° 6, p. 2159-2171. DOI 10.1021/ci6004299.
- REICHARDT, Christina, UTGENANNT, Stephan, STAHMANN, Klaus-Peter, KLEPEL, Olaf et BARIG, Susann, 2018. Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor-made porous carbon material. In : *Biochemical Engineering Journal*. 15 octobre 2018. Vol. 138, p. 63-73. DOI 10.1016/j.bej.2018.07.003.
- RÉJASSE, Barbara, BESSON, Thierry, LEGOY, Marie-Dominique et LAMARE, Sylvain, 2006. Influence of microwave radiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. In : *Organic & Biomolecular Chemistry*. 22 septembre 2006. Vol. 4, n° 19, p. 3703-3707. DOI 10.1039/B610265D.
- REN, Kangzi et LAMSAL, Buddhi P., 2017. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions. In : *Food Chemistry*. 1 janvier 2017. Vol. 214, p. 556-563. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.07.031.
- REYES-DUARTE, Dolores, CASTILLO, Edmundo, MARTÍNEZ, Roberto et LÓPEZ-MUNGUÍA, Agustín, 2002. Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. In : *Biotechnology Letters*. 1 décembre 2002. Vol. 24, n° 24, p. 2057-2061. DOI 10.1023/A:1021371422062.

RONDEL, Caroline, ALRIC, Isabelle, MOULOINGUI, Zéphirin, BLANCO, Jean-François et SILVESTRE, Françoise, 2009. Synthesis and Properties of Lipoamino Acid–Fatty Acid Mixtures: Influence of the Amphiphilic Structure. In : *Journal of Surfactants and Detergents*. 2009. Vol. 12, n° 3, p. 269-275. DOI 10.1007/s11743-009-1121-y.

ROSANO, Germán L. et CECCARELLI, Eduardo A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. In : *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 2014. Vol. 5. [Consulté le 19 août 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2014.00172. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00172/full>.

ROUCHER, Armand, BENTALEB, Ahmed, LAURICHESSE, Eric, DOURGES, Marie-Anne, EMO, Mélanie, SCHMITT, Véronique, BLIN, Jean-Luc et BACKOV, Rénal, 2018a. First Macro-Mesocellular Silica SBA-15-Si(HIPE) Monoliths: Conditions for Obtaining Self-Standing Materials. In : *Chemistry of Materials*. 13 février 2018. Vol. 30, n° 3, p. 864-873. DOI 10.1021/acs.chemmater.7b04483.

SÁ, Amanda Gomes Almeida, MENESES, Alessandra Cristina de, ARAÚJO, Pedro Henrique Hermes de et OLIVEIRA, Débora de, 2017. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. In : *Trends in Food Science & Technology*. 1 novembre 2017. Vol. 69, p. 95-105. DOI 10.1016/j.tifs.2017.09.004.

SAFARY, Azam, MONIRI, Rezvan, HAMZEH-MIVEHROUD, Maryam et DASTMALCHI, Siavoush, 2019. Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halo-thermotolerant *Bacillus* strain. In : *BioImpacts : BI*. 2019. Vol. 9, n° 1, p. 15-23. DOI 10.15171/bi.2019.03.

SAHIN, Selmihan et OZMEN, Ismail, 2020. Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. In : *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 30 mai 2020. Vol. 184, p. 113195. DOI 10.1016/j.jpba.2020.113195.

SAKAI, K., OSHIMA, K. et MORIGUCHI, M., 1991. Production and characterization of N-acyl-D-glutamate amidohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain 5f-1. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 septembre 1991. Vol. 57, n° 9, p. 2540-2543.

SALEM, Jamila Hadj, HUMEAU, Catherine, CHEVALOT, Isabelle, HARSCOAT-SCHIAVO, Christelle, VANDERESSE, Régis, BLANCHARD, Fabrice et FICK, Michel, 2010. Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. In : *Process Biochemistry*. 1 mars 2010. Vol. 45, n° 3, p. 382-389. DOI 10.1016/j.procbio.2009.10.012.

ŠALIĆ, Anita, PINDRIĆ, Katarina et ZELIĆ, Bruno, 2013. Bioproduction of Food Additives Hexanal and Hexanoic Acid in a Microreactor. In : *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1 décembre 2013. Vol. 171, n° 8, p. 2273-2284. DOI 10.1007/s12010-013-0495-5.

ŠALIĆ, Anita et ZELIĆ, Bruno, 2018. Synergy of Microtechnology and Biotechnology: Microreactors as an Effective Tool<sup>[1]</sup> for Biotransformation Processes§. In : *Food Technology and Biotechnology*. décembre 2018. Vol. 56, n° 4, p. 464-479. DOI 10.17113/ftb.56.04.18.5673.

SALIHU, Aliyu et ALAM, Md. Zahangir, 2015. Solvent tolerant lipases: A review. In : *Process Biochemistry*. 1 janvier 2015. Vol. 50, n° 1, p. 86-96. DOI 10.1016/j.procbio.2014.10.019.



SALIHU, Aliyu, ALAM, Md. Zahangir, ABDULKARIM, M. Ismail et SALLEH, Hamzah M., 2011. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 avril 2011. Vol. 69, n° 1, p. 66-73. DOI 10.1016/j.molcatb.2010.12.012.

SALVI, Harshada M., KAMBLE, Manoj P. et YADAV, Ganapati D., 2018. Synthesis of Geraniol Esters in a Continuous-Flow Packed-Bed Reactor of Immobilized Lipase: Optimization of Process Parameters and Kinetic Modeling. In : *Applied Biochemistry and Biotechnology*. février 2018. Vol. 184, n° 2, p. 630-643. DOI 10.1007/s12010-017-2572-7.

SANG, Lung-Ching et COPPENS, Marc-Olivier, 2011. Effects of surface curvature and surface chemistry on the structure and activity of proteins adsorbed in nanopores. In : *Physical Chemistry Chemical Physics*. 14 avril 2011. Vol. 13, n° 14, p. 6689-6698. DOI 10.1039/C0CP02273J.

SARDA, H. Chahiniana and L., 2009. Distinction Between Esterases and Lipases: Comparative Biochemical Properties of Sequence-Related Carboxylesterases. In : *Protein & Peptide Letters* [en ligne]. 30 septembre 2009. [Consulté le 16 janvier 2020]. Disponible à l'adresse : <http://www.eurekaselect.com/84923/article>.

SATYAWALI, Yamini, VANBROEKHOVEN, Karolien et DEJONGHE, Winnie, 2017. Process intensification: The future for enzymatic processes? In : *Biochemical Engineering Journal*. 15 mai 2017. Vol. 121, p. 196-223. DOI 10.1016/j.bej.2017.01.016.

SCHNEIDER, Barbara L., KIUPAKIS, Alexandros K. et REITZER, Lawrence J., 1998. Arginine Catabolism and the Arginine Succinyltransferase Pathway in *Escherichia coli*. In : *Journal of Bacteriology*. 15 août 1998. Vol. 180, n° 16, p. 4278-4286.

SCHRECK, Steven D. et GRUNDEN, Amy M., 2014. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 février 2014. Vol. 98, n° 3, p. 1011-1021. DOI 10.1007/s00253-013-5417-5.

SÉVERAC, Etienne, GALY, Olivier, TURON, Fabrice, PANTEL, Catherine Azzaro, CONDORET, Jean-Stéphane, MONSAN, Pierre et MARTY, Alain, 2011. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 5 janvier 2011. Vol. 48, n° 1, p. 61-70. DOI 10.1016/j.enzmictec.2010.09.008.

SHAH, Pallavi, SRIDEVI, N., PRABHUNE, Asmita et RAMASWAMY, Veda, 2008. Structural features of Penicillin acylase adsorption on APTES functionalized SBA-15. In : *Microporous and Mesoporous Materials*. 1 décembre 2008. Vol. 116, n° 1, p. 157-165. DOI 10.1016/j.micromeso.2008.03.030.

SHAH, Shweta, SOLANKI, Kusum et GUPTA, Munishwar N., 2007. Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes. In : *Chemistry Central Journal*. 29 novembre 2007. Vol. 1, n° 1, p. 30. DOI 10.1186/1752-153X-1-30.

SHAHZADI, Iram, ASIM, Mulazim Hussain, DIZDAREVIĆ, Aida, WOLF, Julian Dominik, KURPIERS, Markus, MATUSZCZAK, Barbara et BERNKOP-SCHNÜRCH, Andreas, 2019. Arginine-based cationic surfactants: Biodegradable auxiliary agents for the formation of hydrophobic ion pairs with hydrophilic macromolecular drugs. In : *Journal of Colloid and Interface Science*. 15 septembre 2019. Vol. 552, p. 287-294. DOI 10.1016/j.jcis.2019.05.057.

SHAN, Changsheng, YANG, Huafeng, SONG, Jiangfeng, HAN, Dongxue, IVASKA, Ari et NIU, Li, 2009. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. In : *Analytical Chemistry*. 15 mars 2009. Vol. 81, n° 6, p. 2378-2382. DOI 10.1021/ac802193c.

SHELDON, R. A., 2007. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. In : *Biochemical Society Transactions*. 1 décembre 2007. Vol. 35, n° 6, p. 1583-1587. DOI 10.1042/BST0351583.

SHELDON, Roger A., 2012. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. In : *Chemical Society Reviews*. 30 janvier 2012. Vol. 41, n° 4, p. 1437-1451. DOI 10.1039/C1CS15219J.

SHELDON, Roger A., 2016. Biocatalysis and Biomass Conversion in Alternative Reaction Media. In : *Chemistry – A European Journal*. 2016. Vol. 22, n° 37, p. 12984-12999. DOI 10.1002/chem.201601940.

SHELDON, Roger A., 2017. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. In : *Green Chemistry*. 3 janvier 2017. Vol. 19, n° 1, p. 18-43. DOI 10.1039/C6GC02157C.

SHELDON, Roger A. et BRADY, Dean, 2019. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. In : *ChemSusChem*. 2019. Vol. 12, n° 13, p. 2859-2881. DOI 10.1002/cssc.201900351.

SHELDON, Roger A. et PEREIRA, Pedro C., 2017. Biocatalysis engineering: the big picture. In : *Chemical Society Reviews*. 22 mai 2017. Vol. 46, n° 10, p. 2678-2691. DOI 10.1039/C6CS00854B.

SHELDON, Roger A. et WOODLEY, John M., 2018a. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. In : *Chemical Reviews*. 24 janvier 2018. Vol. 118, n° 2, p. 801-838. DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00203.

SHEN, Chun-Ting, HSU, Shih-Lan et CHANG, Chieh-Ming J., 2008. Co-solvent-modified supercritical carbon dioxide extractions of cholesterol and free amino acids from soft-shell turtle fish egg. In : *Separation and Purification Technology*. 20 avril 2008. Vol. 60, n° 2, p. 215-222. DOI 10.1016/j.seppur.2007.08.014.

SHENG, Weiqin, XI, Yinyin, ZHANG, Luting, YE, Ting et ZHAO, Xueqin, 2018. Enhanced activity and stability of papain by covalent immobilization on porous magnetic nanoparticles. In : *International Journal of Biological Macromolecules*. 15 juillet 2018. Vol. 114, p. 143-148. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.088.

SHI, Ting-Ting, FANG, Zheng, ZENG, Wen-Bo, YANG, Zhao, HE, Wei et GUO, Kai, 2019. Design, synthesis and properties investigation of N $\alpha$ -acylation lysine based derivatives. In : *RSC Advances*. 1 mars 2019. Vol. 9, n° 13, p. 7587-7593. DOI 10.1039/C9RA00213H.

SIEBENHALLER, Sascha, MUHLE-GOLL, Claudia, LUY, Burkhard, KIRSCHHÖFER, Frank, BRENNER-WEISS, Gerald, HILLER, Ekkehard, GÜNTHER, Michael, RUPP, Steffen, ZIBEK, Susanne et SYLDATK, Christoph, 2016. Sustainable enzymatic synthesis of glycolipids in a deep eutectic solvent system. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 novembre 2016. Vol. 133, p. S281-S287. DOI 10.1016/j.molcatb.2017.01.015.

SILVEIRA, Rodrigo L., MARTÍNEZ, Julian, SKAF, Munir S. et MARTÍNEZ, Leandro, 2012. Enzyme Microheterogeneous Hydration and Stabilization in Supercritical Carbon Dioxide. In :

*The Journal of Physical Chemistry B*. 17 mai 2012. Vol. 116, n° 19, p. 5671-5678. DOI 10.1021/jp3017858.

SINGH, Surinder Mohan et PANDA, Amulya Kumar, 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. In : *Journal of Bioscience and Bioengineering*. avril 2005. Vol. 99, n° 4, p. 303-310. DOI 10.1263/jbb.99.303.

SINGH, Swati, KUMAR, Ashok, KHARE, Shashi, MULCHANDANI, Ashok et RAJESH, 2014. Single-walled carbon nanotubes based chemiresistive genosensor for label-free detection of human rheumatic heart disease. In : *Applied Physics Letters*. 24 novembre 2014. Vol. 105, n° 21, p. 213701. DOI 10.1063/1.4902447.

SINGH, Vikas et GOYAL, Srashti Gopal, 2014. Penicillin G Acylase, a biocatalyst and its potential application. In : *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2014. Vol. 5, n° 5, p. 153-158.

SIO, Charles F., OTTEN, Linda G., COOL, Robbert H., DIGGLE, Stephen P., BRAUN, Peter G., BOS, Rein, DAYKIN, Mavis, CÁMARA, Miguel, WILLIAMS, Paul et QUAX, Wim J., 2006. Quorum Quenching by an N-Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. In : *Infection and Immunity*. 1 mars 2006. Vol. 74, n° 3, p. 1673-1682. DOI 10.1128/IAI.74.3.1673-1682.2006.

SMALLRIDGE, A. J., TREWHELLA, M. A. et WANG, Z., 2002. The enzyme-catalysed stereoselective transesterification of phenylalanine derivatives in supercritical carbon dioxide. In : *Australian Journal of Chemistry*. 2002. Vol. 55, n° 4, p. 259-262. DOI 10.1071/CH01018.

SOLSONA, M., VOLLENBROEK, J. C., TREGOUET, C. B. M., NIEUWELINK, A.-E., OLTHUIS, W., BERG, A. van den, WECKHUYSEN, B. M. et ODIJK, M., 2019. Microfluidics and catalyst particles. In : *Lab on a Chip*. 22 octobre 2019. Vol. 19, n° 21, p. 3575-3601. DOI 10.1039/C9LC00318E.

SOO, E. L., SALLEH, A. B., BASRI, M., RAHMAN, Rnza et KAMARUDDIN, K., 2004a. Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. In : *Process Biochemistry*. 30 juillet 2004. Vol. 39, n° 11, p. 1511-1518. DOI 10.1016/S0032-9592(03)00279-6.

SOO, Ee Lin, SALLEH, Abu Bakar, BASRI, Mahiran, ZALIHA RAJA ABDUL RAHMAN, Raja Noor et KAMARUDDIN, Kamarulzaman, 2003a. Optimization of the enzyme-catalyzed synthesis of amino acid-based surfactants from palm oil fractions. In : *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1 janvier 2003. Vol. 95, n° 4, p. 361-367. DOI 10.1016/S1389-1723(03)80068-3.

SØRENSEN, Hans Peter et MORTENSEN, Kim Kusk, 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. In : *Microbial Cell Factories*. 4 janvier 2005. Vol. 4, n° 1, p. 1. DOI 10.1186/1475-2859-4-1.

SORIANO, Nestor U., VENDITTI, Richard, SAQUING, Carl D., BUSHEY, Dean et ARGYROPOULOS, Dimitris S., 2008. Solubilizing amino acids and polypeptides in supercritical CO<sub>2</sub> via reverse micelle formation. In : *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 15 février 2008. Vol. 315, n° 1, p. 110-116. DOI 10.1016/j.colsurfa.2007.07.019.

SPAN, Roland et WAGNER, Wolfgang, 1996. A New Equation of State for Carbon Dioxide Covering the Fluid Region from the Triple-Point Temperature to 1100 K at Pressures up to 800

MPa. In : *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1 novembre 1996. Vol. 25, n° 6, p. 1509-1596. DOI 10.1063/1.555991.

SPARKS, Darrell L., ESTÉVEZ, L. Antonio, HERNANDEZ, Rafael, MCEWEN, Jason et FRENCH, Todd, 2010. Solubility of Small-Chain Carboxylic Acids in Supercritical Carbon Dioxide. In : *Journal of Chemical & Engineering Data*. 11 novembre 2010. Vol. 55, n° 11, p. 4922-4927. DOI 10.1021/je100504h.

SPENCE, David W. et RAMSDEN, Martin, 2007. Penicillin Acylases. In : POLAINA, Julio et MACCABE, Andrew P. (éd.), *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. p. 583-597. [Consulté le 7 octobre 2019]. ISBN 978-1-4020-5377-1. Disponible à l'adresse : [https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0\\_33](https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_33).

SREENU, Madhumanchi, PRASAD, Rachapudi Badari Narayana, SUJITHA, Pombala et KUMAR, Chityal Ganesh, 2015. Synthesis and Surface-Active Properties of Sodium N-Acylphenylalanines and Their Cytotoxicity. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 25 février 2015. Vol. 54, n° 7, p. 2090-2098. DOI 10.1021/ie503764v.

SREENU, Madhumanchi, RAO, Bhamidipati V. S. K., PRASAD, Rachapudi Badari Narayana, SUJITHA, Pombala et CHITYALA, Ganesh Kumar, 2014. Synthesis, surface and biological properties of sodium N-acyl isoleucines. In : *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2014. Vol. 116, n° 2, p. 193-206. DOI 10.1002/ejlt.201300189.

SRIRANGAN, Kajan, ORR, Valerie, AKAWI, Lamees, WESTBROOK, Adam, MOO-YOUNG, Murray et CHOU, C. Perry, 2013. Biotechnological advances on Penicillin G acylase: Pharmaceutical implications, unique expression mechanism and production strategies. In : *Biotechnology Advances*. 1 décembre 2013. Vol. 31, n° 8, p. 1319-1332. DOI 10.1016/j.biotechadv.2013.05.006.

STAHL, Egon, SCHILZ, Winfried, SCHÜTZ, Erwin et WILLING, Eberhard, 1978. A Quick Method for the Microanalytical Evaluation of the Dissolving Power of Supercritical Gases. In : *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1978. Vol. 17, n° 10, p. 731-738. DOI 10.1002/anie.197807311.

STANKIEWICZ, A. I. et MOULIJN, J. A., 2000. Process intensification: Transforming chemical engineering. In : *Chemical Engineering Progress*. janvier 2000. Vol. 96, n° 1, p. 22-34.

STAUCH, Benjamin, FISHER, Stuart J. et CIANCI, Michele, 2015. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation1. In : *Journal of Lipid Research*. décembre 2015. Vol. 56, n° 12, p. 2348-2358. DOI 10.1194/jlr.M063388.

STEINRÜCK, Hans-Peter et WASSERSCHEID, Peter, 2015. Ionic Liquids in Catalysis. In : *Catalysis Letters*. 1 janvier 2015. Vol. 145, n° 1, p. 380-397. DOI 10.1007/s10562-014-1435-x.

STOJKOVIĆ, Gorazd, PLAZL, Igor et ŽNIDARŠIČ-PLAZL, Polona, 2011. l-Malic acid production within a microreactor with surface immobilised fumarase. In : *Microfluidics and Nanofluidics*. 1 mars 2011. Vol. 10, n° 3, p. 627-635. DOI 10.1007/s10404-010-0696-y.

STORY, Sherry V., GRUNDEN, Amy M. et ADAMS, Michael W. W., 2001. Characterization of an Aminoacylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. In : *Journal of Bacteriology*. 15 juillet 2001. Vol. 183, n° 14, p. 4259-4268. DOI 10.1128/JB.183.14.4259-4268.2001.

SUDAR, Martina, FINDRIK, Zvezdana, VASIĆ-RAČKI, Đurđa, CLAPÉS, Pere et LOZANO, Carles, 2013. Aldol addition of dihydroxyacetone to N-Cbz-3-aminopropanal catalyzed by two aldolases variants in microreactors. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 10 juin 2013. Vol. 53, n° 1, p. 38-45. DOI 10.1016/j.enzmictec.2013.03.013.

SUNDER, Avinash Vellore, UTARI, Putri Dwi, RAMASAMY, Sureshkumar, VAN MERKERK, Ronald, QUAX, Wim et PUNDLE, Archana, 2017. Penicillin V acylases from gram-negative bacteria degrade N-acylhomoserine lactones and attenuate virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 mars 2017. Vol. 101, n° 6, p. 2383-2395. DOI 10.1007/s00253-016-8031-5.

SUNG, Hwan-Do et SHIM, Jae-Jin, 1999. Solubility of C. I. Disperse Red 60 and C. I. Disperse Blue 60 in Supercritical Carbon Dioxide. In : *Journal of Chemical & Engineering Data*. 1 septembre 1999. Vol. 44, n° 5, p. 985-989. DOI 10.1021/jc990018t.

SYREN, Per-Olof, LE JOUBIOUX, Florian, BEN HENDA, Yesmine, MAUGARD, Thierry, HULT, Karl et GRABER, Marianne, 2013. Proton Shuttle Mechanism in the Transition State of Lipase-Catalyzed N-Acylation of Amino Alcohols. In : *Chemcatchem*. juillet 2013. Vol. 5, n° 7, p. 1842-1853. DOI 10.1002/cctc.201200751.

SZELWICKA, Anna, BONCEL, Sławomir, JURCZYK, Sebastian et CHROBOK, Anna, 2019. Exceptionally active and reusable nanobiocatalyst comprising lipase non-covalently immobilized on multi-wall carbon nanotubes for the synthesis of diester plasticizers. In : *Applied Catalysis A: General*. 25 mars 2019. Vol. 574, p. 41-47. DOI 10.1016/j.apcata.2019.01.030.

SZYMAŃSKA, Katarzyna, ODROZEK, Klaudia, ZNISZCZOŁ, Aurelia, PUDŁO, Wojciech et JARZĘBSKI, Andrzej B., 2017. A novel hierarchically structured siliceous packing to boost the performance of rotating bed enzymatic reactors. In : *Chemical Engineering Journal*. 1 mai 2017. Vol. 315, p. 18-24. DOI 10.1016/j.cej.2016.12.131.

SZYMAŃSKA, Katarzyna, ODROZEK, Klaudia, ZNISZCZOŁ, Aurelia, TORRELO, Guzman, RESCH, Verena, HANEFELD, Ulf et JARZĘBSKI, Andrzej B., 2016. MsAcT in siliceous monolithic microreactors enables quantitative ester synthesis in water. In : *Catalysis Science & Technology*. 28 juin 2016. Vol. 6, n° 13, p. 4882-4888. DOI 10.1039/C5CY02067K.

TAKAHASHI, Haruo, LI, Bo, SASAKI, Toshiya, MIYAZAKI, Chie, KAJINO, Tsutomu et INAGAKI, Shinji, 2000. Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on the Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica. In : *Chemistry of Materials*. 1 novembre 2000. Vol. 12, n° 11, p. 3301-3305. DOI 10.1021/cm000487a.

TAKAKURA, Jun et NOZAKI, Hiroyuki, 2018. METHOD FOR PRODUCING N Epsilon-ACYL-L-LYSINE [en ligne]. US20180230502A1. 16 août 2018. [Consulté le 25 octobre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://patents.google.com/patent/US20180230502A1/en>. US15/955,267

TAKAKURA, Yasuaki et ASANO, Yasuhisa, 2019. Purification, characterization, and gene cloning of a novel aminoacylase from *Burkholderia* sp. strain LP5\_18B that efficiently catalyzes the synthesis of N-lauroyl-L-amino acids. In : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 3 octobre 2019. Vol. 83, n° 10, p. 1964-1973. DOI 10.1080/09168451.2019.1630255.

- TAKENOUCI, Rina, INOUE, Kazuhiko, KAMBE, Yuki et MIYATA, Atsuro, 2012. N-arachidonoyl glycine induces macrophage apoptosis via GPR18. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 10 février 2012. Vol. 418, n° 2, p. 366-371. DOI 10.1016/j.bbrc.2012.01.027.
- TAN, Qiang, QIU, Jie, LUO, Xiang, CHEN, Yuquan, LIU, Yuting, WEI, Haihong, LU, Ruochen et WU, Dongmei, 2019a. Using Functionalized Graphene Oxide as Carrier for Immobilization of Glutaryl-7-Aminocephalosporanic Acid Acylase. In : [en ligne]. mai 2019. [Consulté le 12 septembre 2019]. Disponible à l'adresse : <http://www.ingentaconnect.com/content/asp/jnn/2019/00000019/00000005/art00008%3bjsessionid=srrnfeopb8jp.x-ic-live-02>.
- TAN, Qiang, QIU, Jie, LUO, Xiang, CHEN, Yuquan, LIU, Yuting, WEI, Haihong, LU, Ruochen et WU, Dongmei, 2019c. Using Functionalized Graphene Oxide as Carrier for Immobilization of Glutaryl-7-Aminocephalosporanic Acid Acylase. In : *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 1 mai 2019. Vol. 19, n° 5, p. 2501-2505. DOI 10.1166/jnn.2019.15832.
- TANG, Zhao, JIN, Jun-su, ZHANG, Ze-ting et LIU, Hong-tao, 2012. New Experimental Data and Modeling of the Solubility of Compounds in Supercritical Carbon Dioxide. In : *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 18 avril 2012. Vol. 51, n° 15, p. 5515-5526. DOI 10.1021/ie2016224.
- TANG, Zhen-Yu, YU, Jian-Yuan, ZHOU, Qun, HE, Biao, WANG, Ze-Feng et ZHOU, Hai-Meng, 1995. Secondary Structure of Holo- and Apo-Aminoacylase from Prediction, Circular Dichroism, and FT-Raman Spectroscopy. In : *The Journal of Biochemistry*. 1 octobre 1995. Vol. 118, n° 4, p. 706-709. DOI 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124969.
- THANGARAJ, Baskar et SOLOMON, Pravin Raj, 2019. Immobilization of Lipases – A Review. Part II: Carrier Materials. In : *ChemBioEng Reviews*. 2019. Vol. 6, n° 5, p. 167-194. DOI 10.1002/cben.201900017.
- THOMPSON, Matthew P., PEÑAFIEL, Itziar, COSGROVE, Sebastian C. et TURNER, Nicholas J., 2019. Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals. In : *Organic Process Research & Development*. 18 janvier 2019. Vol. 23, n° 1, p. 9-18. DOI 10.1021/acs.oprd.8b00305.
- TIOSSO, P. C., CARVALHO, A. K. F., CASTRO, H. F. de, MORAES, F. F. de et ZANIN, G. M., 2014. Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. In : *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. décembre 2014. Vol. 31, n° 4, p. 839-847. DOI 10.1590/0104-6632.20140314s00003006.
- TISHKOV, V.I., SAVIN, S.S. et YASNAYA, A.S., 2010. Protein Engineering of Penicillin Acylase. In : *Acta Naturae*. 2010. Vol. 2, n° 3, p. 47-61.
- TIŠMA, Marina, ZELIĆ, Bruno, VASIĆ-RAČKI, Đurđa, ŽNIDARŠIČ-PLAZL, Polona et PLAZL, Igor, 2009. Modelling of laccase-catalyzed l-DOPA oxidation in a microreactor. In : *Chemical Engineering Journal*. 1 juillet 2009. Vol. 149, n° 1, p. 383-388. DOI 10.1016/j.cej.2009.01.025.
- TOEWS, Karen L., SHROLL, Robert M., WAI, Chien M. et SMART, Neil G., 1995. pH-Defining Equilibrium between Water and Supercritical CO<sub>2</sub>. Influence on SFE of Organics and Metal Chelates. In : *Analytical Chemistry*. 15 novembre 1995. Vol. 67, n° 22, p. 4040-4043. DOI 10.1021/ac00118a002.

TONG, Shuangming, ZHU, Linlin, WANG, Xiaona, LI, Xi, CHANG, Yanhong et LUO, Hui, 2019. Optimization of Cephalosporin C Acylase Immobilization. In : *E3S Web of Conferences*. 2019. Vol. 78, p. 02003. DOI 10.1051/e3sconf/20197802003.

TORRES-GUZMÁN, Raquel, DE LA MATA, Isabel, TORRES-BACETE, Jesús, ARROYO, Miguel, CASTILLÓN, María Pilar et ACEBAL, Carmen, 2001. Chemical mechanism of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae*: pH-dependence of kinetic parameters. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 20 novembre 2001. Vol. 16, n° 1, p. 33-41. DOI 10.1016/S1381-1177(01)00042-X.

TRIPATHY, Divya B., MISHRA, Anuradha, CLARK, James et FARMER, Thomas, 2018. Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review. In : *Comptes Rendus Chimie*. 1 février 2018. Vol. 21, n° 2, p. 112-130. DOI 10.1016/j.crci.2017.11.005.

TROTTIER, Jocelyn, MILKIEWICZ, Piotr, KAEDING, Jenny, VERREAULT, Mélanie et BARBIER, Olivier, 2006. Coordinate Regulation of Hepatic Bile Acid Oxidation and Conjugation by Nuclear Receptors. In : *Molecular Pharmaceutics*. 1 juin 2006. Vol. 3, n° 3, p. 212-222. DOI 10.1021/mp060020t.

TSIRULNIKOV, Kirill, ABULADZE, Natalia, BRAGIN, Anatol, FAULL, Kym, CASCIO, Duilio, DAMOISEAUX, Robert, SCHIBLER, Matthew J. et PUSHKIN, Alexander, 2012. Inhibition of aminoacylase 3 protects rat brain cortex neuronal cells from the toxicity of 4-hydroxy-2-nonenal mercapturate and 4-hydroxy-2-nonenal. In : *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15 septembre 2012. Vol. 263, n° 3, p. 303-314. DOI 10.1016/j.taap.2012.07.002.

TSIRULNIKOV, Kirill, ABULADZE, Natalia, NEWMAN, Debra, RYAZANTSEV, Sergey, WOLAK, Talya, MAGILNICK, Nathaniel, KOAG, Myong-Chul, KURTZ, Ira et PUSHKIN, Alexander, 2009. Mouse aminoacylase 3: A metalloenzyme activated by cobalt and nickel. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1 juillet 2009. Vol. 1794, n° 7, p. 1049-1057. DOI 10.1016/j.bbapap.2009.03.022.

TUDORACHE, Madalina, MAHALU, Diana, TEODORESCU, Cristian, STAN, Razvan, BALA, Camelia et PARVULESCU, Vasile I., 2011. Biocatalytic microreactor incorporating HRP anchored on micro-/nano-lithographic patterns for flow oxidation of phenols. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 mai 2011. Vol. 69, n° 3, p. 133-139. DOI 10.1016/j.molcatb.2011.01.007.

TUFIÑO, Carolina, BERNAL, Claudia, OTTONE, Carminna, ROMERO, Oscar, ILLANES, Andrés et WILSON, Lorena, 2019. Synthesis with Immobilized Lipases and Downstream Processing of Ascorbyl Palmitate. In : *Molecules*. janvier 2019. Vol. 24, n° 18, p. 3227. DOI 10.3390/molecules24183227.

TUFVESSON, Pär, ANNERLING, Annika, HATTI-KAUL, Rajni et ADLERCREUTZ, Dietlind, 2007. Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides. In : *Biotechnology and Bioengineering*. 15 juin 2007. Vol. 97, n° 3, p. 447-453. DOI 10.1002/bit.21258.

UPPENBERG, Jonas, HANSEN, Mogens Trier, PATKAR, Shamkant et JONES, T. Alwyn, 1994a. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. In : *Structure*. 1 avril 1994. Vol. 2, n° 4, p. 293-308. DOI 10.1016/S0969-2126(00)00031-9.

- UPPENBERG, Jonas, HANSEN, Mogens Trier, PATKAR, Shamkant et JONES, T. Alwyn, 1994b. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. In : *Structure*. 1 avril 1994. Vol. 2, n° 4, p. 293-308. DOI 10.1016/S0969-2126(00)00031-9.
- UPPENBERG, Jonas, OEHRNER, Niklas, NORIN, Martin, HULT, Karl, KLEYWEGT, Gerard J., PATKAR, Shamkant, WAAGEN, Viggo, ANTHONSEN, Thorleif et JONES, T. Alwyn, 1995. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. In : *Biochemistry*. 1 décembre 1995. Vol. 34, n° 51, p. 16838-16851. DOI 10.1021/bi00051a035.
- VAIDYA, Bhalchandra K., KUWAR, Suyog S., GOLEGAONKAR, Sandeep B. et NENE, Sanjay N., 2012. Preparation of cross-linked enzyme aggregates of l-aminoacylase via co-aggregation with polyethyleneimine. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 février 2012. Vol. 74, n° 3, p. 184-191. DOI 10.1016/j.molcatb.2011.10.003.
- VAISALI, C., BELUR, Prasanna D. et REGUPATHI, Iyyaswami, 2017. Lipase mediated synthesis of rutin fatty ester: Study of its process parameters and solvent polarity. In : *Food Chemistry*. 1 octobre 2017. Vol. 232, p. 278-285. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.03.168.
- VALIVETY, Rao, GILL, Iqbal S. et VULFSON, Evgeny N., 1998. Application of enzymes to the synthesis of amino acid-based bola and gemini surfactants. In : *Journal of Surfactants and Detergents*. 1998. Vol. 1, n° 2, p. 177-185. DOI 10.1007/s11743-998-0017-3.
- VALIVETY, Rao, JAUREGI, Paula, GILL, Iqbal et VULFSON, Evgeny, 1997. Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants. In : *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1997. Vol. 74, n° 7, p. 879-886. DOI 10.1007/s11746-997-0232-8.
- VANDA, Henni, DAI, Yuntao, WILSON, Erica G., VERPOORTE, Robert et CHOI, Young Hae, 2018. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. In : *Comptes Rendus Chimie*. 1 juin 2018. Vol. 21, n° 6, p. 628-638. DOI 10.1016/j.crci.2018.04.002.
- VARAEE, Mona, HONARVAR, Masoud, EIKANI, Mohammad H., OMIDKHAH, Mohammad R. et MORAKI, Narges, 2019. Supercritical fluid extraction of free amino acids from sugar beet and sugar cane molasses. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 février 2019. Vol. 144, p. 48-55. DOI 10.1016/j.supflu.2018.10.007.
- VAYSSE, Laurent, LY, Aboubakry, MOULIN, Guy et DUBREUCQ, Eric, 2002. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 3 octobre 2002. Vol. 31, n° 5, p. 648-655. DOI 10.1016/S0141-0229(02)00166-7.
- VAZQUEZ, Luis, BANARES, Celia, TORRES, Carlos F. et REGLERO, Guillermo, 2020. Green Technologies for the Production of Modified Lipids. In : DOYLE, M. P. et MCCLEMENTS, D. J. (éd.), *Annual Review of Food Science and Technology, Vol 11*. Palo Alto : Annual Reviews. p. 319-337.
- VEDARAMAN, N., BRUNNER, G., SRINIVASA KANNAN, C., RAMABRAHMAM, B. V. et RAO, P. G., 2004a. Solubility of N-CBZ derivatised amino acids in supercritical carbon dioxide. In : *The Journal of Supercritical Fluids*. 1 juillet 2004. Vol. 30, n° 2, p. 119-125. DOI 10.1016/j.supflu.2003.07.005.



- VEKARIYA, Rohit L., 2017. A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. In : *Journal of Molecular Liquids*. 1 février 2017. Vol. 227, p. 44-60. DOI 10.1016/j.molliq.2016.11.123.
- VENKATACHALAM, C. M., JIANG, X., OLDFIELD, T. et WALDMAN, M., 2003. LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. In : *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 1 janvier 2003. Vol. 21, n° 4, p. 289-307. DOI 10.1016/S1093-3263(02)00164-X.
- VERGER, Robert et DE HAAS, Gérard H., 1976. Interfacial Enzyme Kinetics of Lipolysis. In : *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1976. Vol. 5, n° 1, p. 77-117. DOI 10.1146/annurev.bb.05.060176.000453.
- VIKAS, Singh et SRASHTI, Gopal Goyal, 2014. Penicillin G Acylase, a biocatalyst and its potential application. In : *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2014. Vol. 5, n° 5, p. 153-158.
- VILLA, Rocio, ALVAREZ, Elena, PORCAR, Raul, GARCIA-VERDUGO, Eduardo, LUIS, Santiago V. et LOZANO, Pedro, 2019. Ionic liquids as an enabling tool to integrate reaction and separation processes. In : *Green Chemistry*. 10 décembre 2019. Vol. 21, n° 24, p. 6527-6544. DOI 10.1039/C9GC02553G.
- VILLENEUVE, Pierre, 2007. Lipases in lipophilization reactions. In : *Biotechnology Advances*. 1 novembre 2007. Vol. 25, n° 6, p. 515-536. DOI 10.1016/j.biotechadv.2007.06.001.
- VOBECKÁ, Lucie, ROMANOV, Alexandr, SLOUKA, Zdeněk, HASAL, Pavel et PŘIBYL, Michal, 2018. Optimization of aqueous two-phase systems for the production of 6-aminopenicillanic acid in integrated microfluidic reactors-separators. In : *New Biotechnology*. 25 décembre 2018. Vol. 47, p. 73-79. DOI 10.1016/j.nbt.2018.03.005.
- VOGEL, Henry J. et BONNER, David M., 1956. Acetylornithinase of Escherichia Coli: Partial Purification and Some Properties. In : *Journal of Biological Chemistry*. 1 janvier 1956. Vol. 218, n° 1, p. 97-106.
- WADA, Eiko, HANDA, Masato, IMAMURA, Koreyoshi, SAKIYAMA, Takaharu, ADACHI, Shuji, MATSUNO, Ryuichi et NAKANISHI, Kazuhiro, 2002. Enzymatic synthesis of N-acyl-L-amino acids in a glycerol-water system using acylase I from pig kidney. In : *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2002. Vol. 79, n° 1, p. 41-46. DOI 10.1007/s11746-002-0432-7.
- WAHJUDI, Mariana, PAPAIOANNOU, Evelina, HENDRAWATI, Oktavia, VAN ASSEN, Aart H. G., VAN MERKERK, Ronald, COOL, Robbert H., POELARENDS, Gerrit J. et QUAX, Wim J., 2011. PA0305 of Pseudomonas aeruginosa is a quorum quenching acylhomoserine lactone acylase belonging to the Ntn hydrolase superfamily. In : *Microbiology (Reading, England)*. juillet 2011. Vol. 157, n° Pt 7, p. 2042-2055. DOI 10.1099/mic.0.043935-0.
- WANG, Lei, ZHANG, Yang, ZHANG, Yuxin, ZHENG, Lu, HUANG, He et WANG, Zhi, 2018. Synthesis of 2-Ethylhexyl Palmitate Catalyzed by Enzyme Under Microwave. In : *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1 mai 2018. Vol. 185, n° 1, p. 347-356. DOI 10.1007/s12010-017-2666-2.

WANG, Yajun et CARUSO, Frank, 2005. Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation. In : *Chemistry of Materials*. 1 mars 2005. Vol. 17, n° 5, p. 953-961. DOI 10.1021/cm0483137.

WANG, Zhi, ZHANG, Yuxin, ZHENG, Lu, CUI, Xiuyun, HUANG, He, GENG, Xin et XIE, Xiaona, 2018. Regioselective acylation of resveratrol catalyzed by lipase under microwave. In : *Green Chemistry Letters and Reviews*. 3 juillet 2018. Vol. 11, n° 3, p. 312-317. DOI 10.1080/17518253.2018.1500646.

WARDENGA, Rainer, LINDNER, Holger A., HOLLMANN, Frank, THUM, Oliver et BORNSCHEUER, Uwe, 2010. Increasing the synthesis/hydrolysis ratio of aminoacylase 1 by site-directed mutagenesis. In : *Biochimie*. 1 janvier 2010. Vol. 92, n° 1, p. 102-109. DOI 10.1016/j.biochi.2009.09.017.

WASHMON-KRIEL, Lisa, JIMENEZ, Victoria L et BALKUS, Kenneth J, 2000. Cytochrome c immobilization into mesoporous molecular sieves. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2 octobre 2000. Vol. 10, n° 5, p. 453-469. DOI 10.1016/S1381-1177(99)00123-X.

WAUVEN, C. Vander et STALON, V., 1985. Occurrence of succinyl derivatives in the catabolism of arginine in *Pseudomonas cepacia*. In : *Journal of Bacteriology*. 1 novembre 1985. Vol. 164, n° 2, p. 882-886.

WEBER, N., BERGANDER, K., FEHLING, E., KLEIN, E., VOSMANN, K. et MUKHERJEE, K. D., 2006. Copolymeric polythioesters by lipase-catalyzed thioesterification and transtioesterification of  $\alpha,\omega$ -alkanedithiols. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 avril 2006. Vol. 70, n° 3, p. 290-297. DOI 10.1007/s00253-005-027-5.

WEBER, Nikolaus, KLEIN, Erika et MUKHERJEE, Kumar D., 1999. Solvent-free lipase-catalyzed thioesterification and transtioesterification of fatty acids and fatty acid esters with alkanedithiols in Vacuo. In : *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1 novembre 1999. Vol. 76, n° 11, p. 1297-1300. DOI 10.1007/s11746-999-0142-z.

WEBSTER, L. T., SIDDIQUI, U. A., LUCAS, S. V., STRONG, J. M. et MIEYAL, J. J., 1976. Identification of separate acyl-CoA:glycine and acyl-CoA:L-glutamine N-acyltransferase activities in mitochondrial fractions from liver of rhesus monkey and man. In : *Journal of Biological Chemistry*. 6 octobre 1976. Vol. 251, n° 11, p. 3352-3358.

WEE, Youngho, PARK, Seunghwan, KWON, Young Hyeon, JU, Youngjun, YEON, Kyung-Min et KIM, Jungbae, 2019. Tyrosinase-immobilized CNT based biosensor for highly-sensitive detection of phenolic compounds. In : *Biosensors and Bioelectronics*. 1 mai 2019. Vol. 132, p. 279-285. DOI 10.1016/j.bios.2019.03.008.

WEI, Ce, ZHOU, Yan, ZHUANG, Wei, LI, Ganlu, JIANG, Min et ZHANG, Hongman, 2018. Improving the performance of immobilized  $\beta$ -glucosidase using a microreactor. In : *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1 avril 2018. Vol. 125, n° 4, p. 377-384. DOI 10.1016/j.jbiosc.2017.09.011.

WEISS, H. M., PALM, G. J. et RÖHM, K. H., 1995. Thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*: significance of the metal center for catalysis and protein stability. In : *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. novembre 1995. Vol. 376, n° 11, p. 643-649. DOI 10.1515/bchm3.1995.376.11.643.

WOJTUSIK, Mateusz, ZURITA, Mauricio, VILLAR, Juan C., LADERO, Miguel et GARCIA-OCHOA, Felix, 2016. Influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of

lignocellulosic biomass: Effect of mass transfer rate. In : *Bioresource Technology*. 1 septembre 2016. Vol. 216, p. 28-35. DOI 10.1016/j.biortech.2016.05.042.

XIANG, Xinran, SUO, Hongbo, XU, Chao et HU, Yi, 2018. Covalent immobilization of lipase onto chitosan-mesoporous silica hybrid nanomaterials by carboxyl functionalized ionic liquids as the coupling agent. In : *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1 mai 2018. Vol. 165, p. 262-269. DOI 10.1016/j.colsurfb.2018.02.033.

XIE, Wenlei et ZANG, Xuezheng, 2017. Covalent immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil. In : *Food Chemistry*. 15 juillet 2017. Vol. 227, p. 397-403. DOI 10.1016/j.foodchem.2017.01.082.

XU, Long, ZHANG, Li, LI, Daoming, LIU, Pengzhan, TAN, Chin-Ping, WANG, Weifei, LIU, Xiangqian, YANG, Bo, LAN, Dongming et WANG, Yonghua, 2017. Deep Eutectic Solvents Enable the Enhanced Production of n-3 PUFA-Enriched Triacylglycerols. In : *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2017. Vol. 119, n° 12, p. 1700300. DOI 10.1002/ejlt.201700300.

YAGNIK, Asutosh T., LITTLECHILD, Jennifer A. et TURNER, Nicholas J., 1997. Molecular modelling studies of substrate binding to the lipase from *Rhizomucor miehei*. In : *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 1 mai 1997. Vol. 11, n° 3, p. 256-264. DOI 10.1023/A:1007904628011.

YAMAMOTO, Yuki, HASEGAWA, Jun-ya et ITO, Yoshikatsu, 2012. Kinetic investigation on carbamate formation from the reaction of carbon dioxide with amino acids in homogeneous aqueous solution. In : *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2012. Vol. 25, n° 3, p. 239-247. DOI 10.1002/poc.1900.

YANG, Y. B., LIN, C. S., TSENG, C. P., WANG, Y. J. et TSAI, Y. C., 1991. Purification and Characterization of d-Aminoacylase from *Alcaligenes faecalis* DA1. In : *Applied and Environmental Microbiology*. avril 1991. Vol. 57, n° 4, p. 1259-1260.

YANG, Yunn-Bor, HU, Hsiang-Ling, CHANG, Ming-Chung, LI, Hung et TSAI, Ying-Chieh, 1994. Purification and Characterization of l-Aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* DA181. In : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1 janvier 1994. Vol. 58, n° 1, p. 204-205. DOI 10.1271/bbb.58.204.

YANG, Zecheng, NIU, Xuedun, FANG, Xuedong, CHEN, Ge, ZHANG, Hong, YUE, Hong, WANG, Lei, ZHAO, Dantong et WANG, Zhi, 2013. Enantioselective Esterification of Ibuprofen under Microwave Irradiation. In : *Molecules*. mai 2013. Vol. 18, n° 5, p. 5472-5481. DOI 10.3390/molecules18055472.

YANG, Zhen et PAN, Wubin, 2005. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 juin 2005. Vol. 37, n° 1, p. 19-28. DOI 10.1016/j.enzmictec.2005.02.014.

YANG, Zhiyong, GUO, Zheng et XU, Xuebing, 2012. Enzymatic lipophilisation of phenolic acids through esterification with fatty alcohols in organic solvents. In : *Food Chemistry*. 1 juin 2012. Vol. 132, n° 3, p. 1311-1315. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.11.110.

YANG, Zhong, ZHANG, Linlin, ZHANG, Yan, ZHANG, Ting, FENG, Yanye, LU, Xiuxiu, LAN, Wenxian, WANG, Jufang, WU, Houming, CAO, Chunyang et WANG, Xiaoning, 2011. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-

denaturing and refolding method. In : *PloS One*. 2011. Vol. 6, n° 7, p. e22981. DOI 10.1371/journal.pone.0022981.

YEA, DaNan, LEE, SuMin, JO, SeonHui, YU, HyonPil et LIM, JongChoo, 2018a. Preparation of Environmentally Friendly Amino Acid-Based Anionic Surfactants and Characterization of Their Interfacial Properties for Detergent Products Formulation. In : *Journal of Surfactants and Detergents*. 2018. Vol. 21, n° 4, p. 541-552. DOI 10.1002/jsde.12051.

YIU, Humphrey H. P., WRIGHT, Paul A. et BOTTING, Nigel P., 2001. Enzyme immobilisation using siliceous mesoporous molecular sieves. In : *Microporous and Mesoporous Materials*. 6 avril 2001. Vol. 44-45, p. 763-768. DOI 10.1016/S1387-1811(01)00258-X.

YOUSKO, Maxim I, VAN RANTWIJK, Fred et SHELDON, Roger A, 2001. Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by aminoacylase I. In : *Tetrahedron: Asymmetry*. 21 décembre 2001. Vol. 12, n° 23, p. 3267-3271. DOI 10.1016/S0957-4166(01)00563-8.

YU, Dahai, TIAN, Li, WU, Hao, WANG, Song, WANG, Ye, MA, Dongxiao et FANG, Xuexun, 2010. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. In : *Process Biochemistry*. 1 avril 2010. Vol. 45, n° 4, p. 519-525. DOI 10.1016/j.procbio.2009.11.012.

YU, Dahai, WANG, Chuanming, YIN, Yaniu, ZHANG, Aijun, GAO, Gui et FANG, Xuexun, 2011. A synergistic effect of microwave irradiation and ionic liquids on enzyme-catalyzed biodiesel production. In : *Green Chemistry*. 5 juillet 2011. Vol. 13, n° 7, p. 1869-1875. DOI 10.1039/C1GC15114B.

YU, Hyunjong, PARK, Kyung-Min et CHANG, Pahn-Shick, 2020. Lipase-catalyzed synthesis of lauroyl tripeptide-KHA with multi-functionalities: Its surface-active, antibacterial, and antioxidant properties. In : *Food Chemistry*. 30 juillet 2020. Vol. 319, p. 126533. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.126533.

ZAKS, A. et KLIBANOV, A. M., 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 mai 1985. Vol. 82, n° 10, p. 3192-3196. DOI 10.1073/pnas.82.10.3192.

ZAKS, Aleksey et RUSSELL, Alan J., 1988. Enzymes in organic solvents: properties and applications. In : *Journal of Biotechnology*. 1 octobre 1988. Vol. 8, n° 4, p. 259-269. DOI 10.1016/0168-1656(88)90018-1.

ZENG, Chao-Xi, QI, Sui-Jian, XIN, Rui-Pu, YANG, Bo et WANG, Yong-Hua, 2016. Synergistic behavior of betaine–urea mixture: Formation of deep eutectic solvent. In : *Journal of Molecular Liquids*. 1 juillet 2016. Vol. 219, p. 74-78. DOI 10.1016/j.molliq.2016.02.076.

ZENG, Shichao, LIU, Ji, ANANKANBIL, Sampson, CHEN, Ming, GUO, Zheng, ADAMS, Joseph P., SNAJDROVA, Radka et LI, Zhi, 2018. Amide Synthesis via Aminolysis of Ester or Acid with an Intracellular Lipase. In : *ACS Catalysis*. 7 septembre 2018. Vol. 8, n° 9, p. 8856-8865. DOI 10.1021/acscatal.8b02713.

ZHANG, Demin, KOREISHI, Mayuko, IMANAKA, Hiroyuki, IMAMURA, Koreyoshi et NAKANISHI, Kazuhiro, 2007. Cloning and characterization of penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. In : *Journal of Biotechnology*. 10 mars 2007. Vol. 128, n° 4, p. 788-800. DOI 10.1016/j.jbiotec.2006.12.017.

ZHANG, Jiali, ZHANG, Feng, YANG, Haijun, HUANG, Xuelei, LIU, Hui, ZHANG, Jingyan et GUO, Shouwu, 2010. Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization. In : *Langmuir*. 4 mai 2010. Vol. 26, n° 9, p. 6083-6085. DOI 10.1021/la904014z.

ZHANG, Jisong, WANG, Kai, TEIXEIRA, Andrew R., JENSEN, Klavs F. et LUO, Guangsheng, 2017. Design and Scaling Up of Microchemical Systems: A Review. In : *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2017. Vol. 8, n° 1, p. 285-305. DOI 10.1146/annurev-chembioeng-060816-101443.

ZHANG, Meng, STRANDMAN, Satu, WALDRON, Karen C. et ZHU, X. X., 2016. Supramolecular hydrogelation with bile acid derivatives: structures, properties and applications. In : *Journal of Materials Chemistry B*. 30 novembre 2016. Vol. 4, n° 47, p. 7506-7520. DOI 10.1039/C6TB02270G.

ZHANG, Qinghua, VIGIER, Karine De Oliveira, ROYER, Sébastien et JÉRÔME, François, 2012. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. In : *Chemical Society Reviews*. 8 octobre 2012. Vol. 41, n° 21, p. 7108-7146. DOI 10.1039/C2CS35178A.

ZHANG, X., MAOR, Y., WANG, J. F., KUNOS, G. et GROOPMAN, J. E., 2010. Endocannabinoid-like N-arachidonoyl serine is a novel pro-angiogenic mediator. In : *British Journal of Pharmacology*. 2010. Vol. 160, n° 7, p. 1583-1594. DOI 10.1111/j.1476-5381.2010.00841.x.

ZHANG, Xiaoming, ADACHI, Shuji, WATANABE, Yoshiyuki et MATSUNO, Ryuichi, 2005. Lipase-catalyzed synthesis of O-lauroyl l-serinamide and O-lauroyl l-threoninamide. In : *Food Research International*. 1 avril 2005. Vol. 38, n° 3, p. 297-300. DOI 10.1016/j.foodres.2004.05.011.

ZHANG, Yan, ZHANG, Jingyan, HUANG, Xuelei, ZHOU, Xuejiao, WU, Haixia et GUO, Shouwu, 2012. Assembly of Graphene Oxide–Enzyme Conjugates through Hydrophobic Interaction. In : *Small*. 2012. Vol. 8, n° 1, p. 154-159. DOI 10.1002/sml.201101695.

ZHAO, Hua, 2010. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. In : *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2010. Vol. 85, n° 7, p. 891-907. DOI 10.1002/jctb.2375.

ZHAO, Hua, BAKER, Gary A. et HOLMES, Shailetha, 2011. Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 novembre 2011. Vol. 72, n° 3, p. 163-167. DOI 10.1016/j.molcatb.2011.05.015.

ZHAO, Hua, ZHANG, Cheng et CRITTLE, Tanisha D., 2013a. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. In : *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1 janvier 2013. Vol. 85-86, p. 243-247. DOI 10.1016/j.molcatb.2012.09.003.

ZHONG, Chao, LEI, Zhixian, HUANG, Huan, ZHANG, Mingyue, CAI, Zongwei et LIN, Zian, 2020. One-pot synthesis of trypsin-based magnetic metal–organic frameworks for highly efficient proteolysis. In : *Journal of Materials Chemistry B*. 3 juin 2020. Vol. 8, n° 21, p. 4642-4647. DOI 10.1039/C9TB02315A.

ZHOU, Liya, LUO, Xucong, LI, Jiaojiao, MA, Li, HE, Ying, JIANG, Yanjun, YIN, Luyan et GAO, Liya, 2019. Meso-molding three-dimensionally ordered macroporous alumina: A new platform to immobilize enzymes with high performance. In : *Biochemical Engineering Journal*. 15 juin 2019. Vol. 146, p. 60-68. DOI 10.1016/j.bej.2019.03.002.

ZHOU, Qingxuan, ZHOU, Yan Ning, JIN, Ding Jun et TSE-DINH, Yuk-Ching, 2017. Deacetylation of topoisomerase I is an important physiological function of *E. coli* CobB. In : *Nucleic Acids Research*. 19 mai 2017. Vol. 45, n° 9, p. 5349-5358. DOI 10.1093/nar/gkx250.

ZHOU, Zhou et HARTMANN, Martin, 2013. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. In : *Chemical Society Reviews*. 2013. Vol. 42, n° 9, p. 3894. DOI 10.1039/c3cs60059a.

ZIAULLAH et RUPASINGHE, H. P. Vasantha, 2013. An efficient microwave-assisted enzyme-catalyzed regioselective synthesis of long chain acylated derivatives of flavonoid glycosides. In : *Tetrahedron Letters*. 10 avril 2013. Vol. 54, n° 15, p. 1933-1937. DOI 10.1016/j.tetlet.2013.01.103.

ZISIS, Themistoklis, FREDDOLINO, Peter L., TURUNEN, Petri, VAN TEESELING, Muriel C. F., ROWAN, Alan E. et BLANK, Kerstin G., 2015. Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation. In : *Biochemistry*. 29 septembre 2015. Vol. 54, n° 38, p. 5969-5979. DOI 10.1021/acs.biochem.5b00586.

ZNIDARSIC-PLAZL, Polona, 2014. Enzymatic microreactors utilizing non-aqueous media. In : *Chimica Oggi-Chemistry Today*. février 2014. Vol. 32, n° 1, p. 54-60.

ŽNIDARŠIČ-PLAZL, Polona et PLAZL, Igor, 2009. Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor. In : *Process Biochemistry*. 1 octobre 2009. Vol. 44, n° 10, p. 1115-1121. DOI 10.1016/j.procbio.2009.06.003.

ZUCCA, Paolo et SANJUST, Enrico, 2014. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. In : *Molecules*. septembre 2014. Vol. 19, n° 9, p. 14139-14194. DOI 10.3390/molecules190914139.

## ANNEXES

---





## Annexe 1 : Liste non exhaustive des acides aminés acylés et leurs activités biologiques

Acide aminé acylé	Activité biologique	Identification / utilisation	Référence
N-acétyl-L-phénylalanine	Excrété chez les patients malades de phénylcétonurie	Urine	(Goldstein, 1963)
N-acétyl-L-asparagine	N.D	Cerveau humain	(Audit-Ore, Wade, 1972)
Isovaleryl-glycine / asparagine / histidine / lysine / tryptophan Acétyl-tryptophan	Excrété chez les patients malades d'acidémie isovalérique	Urine	(Loots et al., 2005)
N-acétyl-glutamate	Activateur allostérique obligatoire de la carbamyl phosphate synthétase I qui participe à l'uréogénèse	Mitochondrie	(Caldovic et al., 2006)
Arachidonoyl-glycine / alanine / acide gamma amino butyrique (GABA)	Analgésique	Cerveau et autres tissus	(Huang et al., 2001)
N-arachidonoyl-L-sérine	Propriétés vasodilatatrices et vasoprotectrices Améliore l'angiogénèse Propriété pro-neurogènes et neuroprotectrice	Cerveau et autres tissus	(Milman et al., 2006 ; X. Zhang et al., 2010 ; Cohen-Yeshurun et al., 2013)
Acides biliaires + glycine / taurine	Solubilisation et élimination de l'acide biliaire dans les voies biliaires Facilitation de l'absorption intestinale des lipides et vitamines (caractère hydrophobe et propriétés de surface adaptée)	Foie	(Trottier et al., 2006)
N-oléoyl-glycine	Réduction de la température corporelle et de la locomotion (molécule signalé)	ND	(Chaturvedi et al., 2006)
N-acyl-aurine	Augmentation de la sécrétion d'insuline Réduction de la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate	Pancréas et autres	(Chatzakos et al., 2012 ; Aichler et al., 2017)
Arachidonoyl-glycine	Activité anti-inflammatoire Activité pré-apoptotique pour les macrophages	ND	(Takenouchi et al., 2012)
N-10-undécényl-L-phénylalanine	Réduction de la production de mélanine par les mélanocytes	Peau	(Bissett et al., 2009a)
N-acyl-lysine / arginine	Activité antimicrobienne	ND	(Pinazo et al., 2016)
N-acyl-isoleucine	Activité antimicrobienne Activité antioxydante	ND	(Sreenu et al., 2014)
Capryloyl-glycine	Activité antimicrobienne	Peau (traitement de l'acné)	(CosmeticOBS, 2015)

	Diminue l'irritation du cuir chevelu (cas de la dermatite séborrhéique) Limite la production de sébum		
Undecylenoyl glycine	Activité antimicrobienne (élimine la flore indésirable responsable des mauvaises odeurs) Limite production de sébum.	Peau	
Di-palmitoyl hydroxyproline	Activité antirides et protection de la peau en stimulant la contraction des fibres de collagène Activité antioxydant	Peau	
Lauroyl proline	Activité amincissante en limitant l'entrée des acides gras libres dans les adipocytes	ND	
Sodium cocoyl alaninate	Activités antirides en agissant contre les marqueurs cellulaires du vieillissement en particulier les protéines de signalisation	Peau	
Palmitoyl glycine	Activité anti-inflammatoire et antistress par régulation des molécules de signalisation	Peau et cerveau	
Palmitoyl isoleucine	Activité antirides	Peau	

ND : non déterminé

Annexe 2 : conditions supercritiques de certaines molécules et solvants (Gérard, 2016 ; Attard, Hunt, 2018a)

Molécule	Pression (bar)	Température (°C)
Dioxyde de carbone	73,8	31,1
Eau	374,2	220,5
Méthane	46	-82,8
Ethane	48,7	32,2
Propane	42,5	96,7
Ethylène	50,76	9,5
Propylène	46,1	91
Méthanol	80,9	239,5
Ethanol	61,4	240,8
Acétone	47	235
Protoxyde d'azote	33,4	73,5
Ammoniaque	113,2	132,4

Annexe 3 : modèles de prédiction de la solubilité des molécules dans le CO<sub>2</sub> supercritique

Modèle	Equation	Nomenclature	Références
Chrastil pour les solides et les liquides	$\ln y = k \times \ln \rho + \frac{A1}{T} + A2$	<p>k : paramètre associatif qui décrit le nombre de molécules du gaz associé à une molécule de soluté moins le ln du ratio de la masse molaire du substrat (M2) et du CO<sub>2</sub> (M1)</p> <p>A1 et A2 : constantes pour chaque molécule qui correspondent aux coefficients de régression obtenus par les auteurs pour différentes molécules</p> <p>ρ (g / L) : densité du scCO<sub>2</sub></p> <p>T (K) : température</p>	(Chrastil, 1982)
Bartle et al. Pour les solides et les liquides à faible volatilité	$\ln \left( y \times \frac{P}{P_{2ref}} \right) = a \times (\rho - \rho_{pref}) + b'$	<p><math>(y \times \frac{P}{P_{2ref}})</math> : facteur de renforcement où P est la pression et P<sub>2ref</sub> est une pression de référence (0,1 MPa)</p> <p>a : paramètre relié à la solvation du soluté</p> <p>b' : paramètre lié à la pression de vapeur du soluté</p> <p>ρ<sub>pref</sub> (g / L) : densité du scCO<sub>2</sub> (700 g / L)</p>	(Bartle et al., 1991)
Mendez-Santiago et Teja pour les solides	$T \times \ln(y \times P) = E0 \times \rho + E1 \times T + E2$	<p>E0, E1 et E2 : constantes indépendantes de la température obtenue par régression</p>	(Méndez-Santiago, Teja, 1999)

#### Annexe 4 : classification des acylases selon leur spécificité

Nomenclature	Identification	Réaction	Référence
EC 3.5.1.11	Pénicilline acylase	Pénicilline + H <sub>2</sub> O ⇌ acide carboxylique + 6-aminopenicillanate	(Singh, Goyal, 2014)
EC 3.5.1.14	N-acyl-L-acide aminé aliphatique amidohydrolase (aminoacylase I)	N-acyl-L-acide aminé + H <sub>2</sub> O ⇌ L-acide aminé + acide carboxylique	(Henseling, Rohm, 1988 ; Yang et al., 1994 ; Weiss et al., 1995 ; Koreishi et al., 2005a ; Dettori et al., 2017 ; Takakura, Asano, 2019)
EC 3.5.1.15	N-acyl-L-aspartate amidohydrolase (aspartoacylase ou aminoacylase II)	N-acyl-L-aspartate + H <sub>2</sub> O ⇌ acide carboxylique + L-aspartate	(Kots et al., 2019)
EC 3.5.1.16	Acetylornithine deacetylase	N-acetylméthionine + H <sub>2</sub> O ⇌ acetate + L-méthionine	(Vogel, Bonner, 1956)
EC 3.5.1.17	N-ε-acyl-L-lysine amidohydrolase	N-ε-acyl-L-lysine + H <sub>2</sub> O ⇌ acide carboxylique + L-lysine	(Paik et al., 1957 ; Koreishi et al., 2005b ; 2009a)
EC 3.5.1.21	N-acetyl-β-alanine amidohydrolase	N-acetyl-β-alanine + H <sub>2</sub> O ⇌ acetate + β-alanine	(Fujimoto et al., 1968)
EC 3.5.1.55	N-acyl-L-glutamate amidohydrolase	N-acyl-L-glutamate + H <sub>2</sub> O ⇌ acide carboxylique + L-glutamate	(Fukuda et al., 1982)
EC 3.5.1.68	N-formyl-L-glutamate amidohydrolase	N-formyl-L-glutamate + H <sub>2</sub> O ⇌ formate + L-glutamate	(Hu et al., 1987 ; Miyake et al., 1983 ; Baker et al., 1997)
EC 3.5.1.71	N-feruloylglycine amidohydrolase	N-feruloylglycine + H <sub>2</sub> O ⇌ ferulate + glycine	(Martens et al., 1988b ; 1988a)
EC 3.5.1.81	N-acyl-D-amino-acid deacylase	N-acyl-D-amino acid + H <sub>2</sub> O ⇌ acide carboxylique + D-amino acid	(Yang et al., 1991 ; Hambardzumyan et al., 2016)
EC 3.5.1.82	N-acyl-D-glutamate amidohydrolase	N-acyl-D-glutamate + H <sub>2</sub> O ⇌ acide carboxylique + D-glutamate	(Sakai et al., 1991)
EC 3.5.1.83	N-acyl-D-aspartate amidohydrolase	N-acyl-D-aspartate + H <sub>2</sub> O ⇌ acide carboxylique + D-aspartate	(Moriguchi et al., 1993)
EC 3.5.1.93	Cephalosporine acylase	(7R)-7-(4-carboxybutanamido) cephalosporanate + H <sub>2</sub> O ⇌ (7R)-7-aminocephalosporanate + glutarate	(Ishii et al., 1995 ; Monti et al., 2000 ; Kim et al., 2003 ; Tan et al., 2019b)
EC 3.5.1.96	N-succinyl-L-glutamate amidohydrolase	N-succinyl-L-glutamate + H <sub>2</sub> O ⇌ succinate + L-glutamate	(Wauven, Stalon, 1985 ; Schneider et al., 1998 ; Lu, 2006)
EC 3.5.1.97	acyl-homoserine-lactone acylase	N-acyl-L-homoserine lactone + H <sub>2</sub> O ⇌ L-homoserine lactone + acide carboxylique	(Sio et al., 2006 ; Wahjudi et al., 2011 ; Chankhamhaengdecha et al., 2013)
EC 3.5.1.114	N-acyl-aromatic-L-amino acid amidohydrolase (aminoacylase III)	N-acyl- L- acide aminé aromatique + H <sub>2</sub> O ⇌ acide aminé aromatique + acide carboxylique	(Newman et al., 2007 ; Pushkin et al., 2004 ; Tsirulnikov et al., 2009 ; Hsieh et al., 2010 ; Tsirulnikov et al., 2012)



## Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations

Mohamed Chafik Bourkaib, Harifeno Randriamalala, Lena Dettori, Catherine Humeau, Stephane Delaunay, Isabelle Chevalot, Yann Guivarch<sup>a</sup>\*

<sup>a</sup> *Laboratory Reactions and Process Engineering, University of Lorraine, CNRS, IRGP, F-54000 Nancy, France*

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Supercritical CO<sub>2</sub>  
*Candida Antarctica* lipase B  
 Packed bed reactor  
 Solvent free geranyl acetate  
 Green synthesis  
 Catalytic efficiency and stability

### ABSTRACT

As an alternative to the chemical synthesis of geranyl acetate, the aim of the present study is to better understand its enzymatic synthesis in a 1 mL packed bed reactor (PBR) using supercritical CO<sub>2</sub> as a green solvent and immobilized lipase B from *Candida antarctica* as a catalyst. Using a full factorial design in the range 150–300 bar and 45–65 °C, the conversion of geraniol to geranyl acetate versus pressure and temperature could be accurately modeled. The best conversion rate (73.8 ± 0.9%) was observed at 65 °C and 150 bar. Lipase was highly stable at 55 °C–200 bar. In these conditions and due to water accumulation along the PBR, the use of a five-fold longer PBR only led to 73.0 ± 0.1% conversion. The same % conversion could be achieved using 2.5 less enzyme in a two-parallel 1 mL PBR configuration. The positive impact of an increased residence time (Rt) in the PBR was investigated. Conversions of 83% and 98% were achieved with 36 and 27 s Rt at 55 °C–200 bar and 65 °C–150 bar, respectively. These results show that an efficient, green, enzymatic and continuous production of high-purity and solvent-free geranyl acetate is possible with supercritical CO<sub>2</sub>.

### 1. Introduction

Monoterpene esters of short-chain fatty acids such as geraniol, linalool, citronellol or menthol contribute to the good smell of many essential oils. For this reason, they are widely used for the reconstitution of essential oils, as well as in fragrances and flavor industry [1,2]. These esters are hence largely used in cosmetics, pharmaceuticals, perfumes and also food industry as flavoring agent and for their biological activities like antioxidant, antibacterial or anti-inflammatory activities [3–6]. According to a recent BCC Research report from 2016, the global market for flavors and fragrances including these terpene esters was evaluated at \$26.0 billion in 2015. This market is expected to increase from \$27.1 billion in 2016 to \$37.0 billion in 2021 at a compound annual growth rate (CAGR) of 6.4% for 2016–2021 [6]. Geranyl acetate, is one of the most produced terpene esters with linalyl acetate. This ester can be found in essential oils from *Callitris* or *Eucalyptus* species and a smaller amount also occurs in geranium, citronella and lavender oils [1]. But extraction and purification steps are cost and time consuming and sometimes require organic solvents. Instead, chemical esterification of geraniol can be performed by using acetic acid, acetyl chloride (Schotten-Bauman fast reaction) or acetic anhydride (slower

reaction). But these three approaches show all or part of the significant following drawbacks: (i) extreme basic pH (Schotten Bauman requires large amount of NaOH) or acidic pH (the use of acetic acid requires large amount of sulfuric acid as catalyst), (ii) massive chlorine salt production (NaCl), (iii) generation of HCl fumes, (iv) use of organic flammable and toxic co-solvents, (v) necessity to use expensive acetyl chloride, (vi) use of moderate to strong heating, (vii) residual unreacted acyl chloride, (viii) residual acetic acids due to the competitive hydrolysis [7]. In any cases, chemical reactions lead to large volumes of industrial effluent representing environmental issue and a significant cost for industrials. For these reasons, the enzymatic flavor synthesis appears to be a promising alternative. Researchers and industries have switched to enzymatic flavor synthesis instead of chemical one. Actually, the enzymatic synthesized flavor and fragrance esters can be labeled as “natural” [8]. Indeed, these reactions are carried out in mild operating conditions with high specificity and reduced side reaction [9].

Since the discovery by Zaks and Klivanov [10] that enzymes such as hydrolases and more specifically lipases could perform various synthesis reactions in anhydrous media such as organic solvent, many efforts have been put in studying these reactions not only in organic solvent or

\* Corresponding author.

E-mail address: [yann.guivarch@univ-lorraine.fr](mailto:yann.guivarch@univ-lorraine.fr) (Y. Guivarch).

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.008>

Received 6 February 2018; Received in revised form 11 May 2018; Accepted 13 May 2018  
 Available online 15 May 2018

1359-5113/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

solvent free media but also in more eco-compatible solvent such as supercritical fluids. Supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) exhibits many advantages such as (i) its critical point (73.8 bar and 31 °C) that is quite easy to reach and compatible with mild process conditions and enzymes thermal stability, (ii) its properties (viscosity, density, diffusivity, dielectric constant) that can easily be tuned by playing on pressure and/or temperature, (iii) its low-cost, no flammability and non-toxicity that are compatible with industrial scale applications with reduced associated hazards. Last but not least, CO<sub>2</sub> is easily recyclable under pressurized forms making possible to recycle it after appropriate re-pressurization and heating. Finally, the key advantage of using scCO<sub>2</sub> as a solvent is the possibility to develop bioprocesses that can be claimed as “green labelled” because totally free of any trace of organic solvents such as hexane or toluene.

Despite its interest in terms of green and sustainable chemistry, only few studies on geranyl acetate synthesis based on enzymatic esterification or transesterification in supercritical fluids have been published [11–13]. Chulalaksananukul et al. [11] were the first to describe the biosynthesis of geranyl acetate by transesterification between ethyl acetate (200 mM) and geraniol (60 mM) in a batch stirred tank reactor (BSTR) using a scCO<sub>2</sub> at 40 °C and 100 bar and 100 mg of macroporous anionic resins beads supporting lipase from *Mucor miehei* as a catalyst. By appropriately controlling the water content of the reaction mixture (10%, w/w) about 30% conversion after 24 h was reached.

Couto et al. [13] investigated the synthesis of geranyl acetate catalyzed by the Novozym® 435, the lipase B from *Candida antarctica* non-covalently immobilized in macroporous acrylic beads, both in batch stirred reactor (BSTR) and packed bed reactor (PBR). In PBR and using equimolar concentrations of geraniol and acetic acid (100 mM) in a 0.25 mL min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> flow rate at 35 °C and 100 bar with 900 mg of Novozym® 435 beads pre-equilibrated at a water activity of 0.23, these authors reached a good and stable steady-state conversion of about 87% over 14 days. One key advantage of the PBR versus the BSTR, when using esterification instead of transesterification, is that the water released by the reaction is continuously removed from the reactor by the CO<sub>2</sub> flow in which water is very slightly soluble, thus limiting the risk of hydrolysis. PBR are continuous reactors widely used in the chemical and biochemical industry due to their relative simplicity and their convenience. As an illustration, Dos Santos et al. [14] recently demonstrated that PBR was the best option, as compared to batch reactors, for the enzymatic synthesis of isoamyl-acetate in supercritical CO<sub>2</sub>. To date, besides the information achieved by [13] at one single pressure-temperature couple, there is a true lack of data on the enzymatic production of geranyl acetate by esterification in a continuous process (packed bed reactor) with supercritical CO<sub>2</sub> as a green solvent.

In the framework of a process intensification, the aim of this study was therefore mainly to investigate the potential of the immobilized *Candida antarctica* lipase B (Lipozyme® 435) in such operating conditions but using different conditions of pressure and temperature in order to achieve a better knowledge on the best pressure-temperature conditions for the geranyl acetate production. Other aspects such as the time necessary to achieve steady state conditions with various PBR lengths and the influence of the PBR length on the conversion rate were investigated and will be discussed together with results on the influence of the CO<sub>2</sub> flow-rate (i.e. residence time of CO<sub>2</sub> and substrates in the PBR) on the conversion rate. The operational stability of the catalyst, which is as key factor in the perspective of an industrial production of a “green labelled” geranyl acetate of interest for cosmetic, pharmaceutical and food industry, will be also described.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

Lipozyme® 435, which consists of *Candida antarctica* Lipase B (CALB) physically immobilized on macroporous poly(methyl methacrylate-co-

divinylbenzene) beads [13], was kindly supplied by Novozymes. Pure industrial carbon dioxide (class 4.5, 99.995%) was collected in a bottle equipped with a dip tube from Messer Group GmbH (Krefeld, Germany). Geraniol (purity ≥ 97%), acetic acid (purity ≥ 99.8%), geranyl acetate (purity > 98%), methyl decanoate (purity ≥ 99.5%) were all from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). Acetone (purity 99.8%) was from Carlo Erba (Val de Reuil, France).

### 2.2. Water activity and water content measurements

During storage, the water activity of Lipozyme® 435 was adjusted to 0.23 at 10 °C thanks to the microclimate method using a saturated salt solution of potassium acetate [15]. The water activity was then controlled with a Novasina Lab-Master aw-meter (Basel, Switzerland) at 10 °C and was observed as remaining 0.23 when measured at 25 °C. The water content of the Lipozyme® 435 adjusted at  $a_w = 0.23$  was found to be 0.41% (w/w) based on a triplicate measurement with a Mettler Toledo Karl-Fisher C20 coulometric titrimer equipped with a DO-308 oven using nitrogen gas.

### 2.3. Analysis

Products analysis was performed by gas chromatography using an Agilent 7890 A gas chromatograph equipped with a FID detector for quantification and coupled with an Agilent 7000 A MS triple quad detector (Agilent technologies, Santa Clara, USA) for ensuring qualitative analysis. 1 µL volume samples were injected with a split ratio of 100:1 using an Agilent 7683B auto-sampler (Agilent technologies, Santa Clara, USA) with an injection temperature of 240 °C. We used an Agilent HP-INNOWax 30 m × 0.32 mm internal diameter × 0.25 µm column. Oven temperature was 60 °C during 2 min. Temperature was then increased up to 200 °C at 10 °C/min and from 200 °C to 220 °C at 5 °C/min. The temperature of the FID detector was set at 250 °C. Pure helium was used as a mobile phase at 1.5 mL/min flow. Methyl decanoate was used as an internal standard. The calibration curves of the acetic acid, geraniol and geranyl acetate presented R<sup>2</sup> values of 0.99. The limits of quantification (detection) were found to be 20.7 (6.2) mg/L for acetic acid, 48.6 (14.6) mg/L for geraniol, and 54.8 (16.4) mg/L for geranyl acetate.

### 2.4. Geranyl acetate synthesis in supercritical carbon dioxide

Geranyl acetate enzymatic synthesis was conducted in triplicate, for each tested process condition, through a packed bed reactor (PBR) by using a continuous automated high-pressure supercritical fluid equipment (SFC-CO<sub>2</sub>) from JASCO (Tokyo, Japan). This equipment consisted in a CO<sub>2</sub> pump (Pu-2080-CO<sub>2</sub> Plus unit, JASCO, Japan) and a semi-micro HPLC pump for the two reaction substrates mixed together (Pu-2085 Plus unit, JASCO, Japan). The liquid CO<sub>2</sub> pump was equipped with an internal Peltier cooling system for cooling at -4 °C. In order to be sure that all CO<sub>2</sub> coming from the CO<sub>2</sub> bottle was in the liquid form, before pumping by the CO<sub>2</sub> pump, an additional cooling of CO<sub>2</sub> at -4 °C was performed with a Lauda RM6 cryostat (Lauda-Königshofen, Germany). The pressure was controlled with an automated back pressure regulator (BP-2085 Plus unit, JASCO, Japan) at a precision of ± 0.2 MPa of the setting value. This back pressure regulator (BPR) is based on the use of a CO<sub>2</sub> flow-switching valve (FSV) mechanism that enables stable system pressure control together with efficient collection of the SFE extract in a glass tube. Because CO<sub>2</sub> decompression is highly endothermic (Joule-Thomson effect), especially when using “high” CO<sub>2</sub> mass flow, and can generate CO<sub>2</sub> dry ice at the exit of the BPR, the latter was equipped with an internal Peltier heating system maintained at 60 °C in order to avoid CO<sub>2</sub> solidification during decompression. A 30 mm lengths × 4.6 mm diameter Sulzer SMX™ stainless steel static mixer (Winterthur, Switzerland) was used for mixing scCO<sub>2</sub> and substrates before their entrance in the packed bed reactor (PBR). This PBR

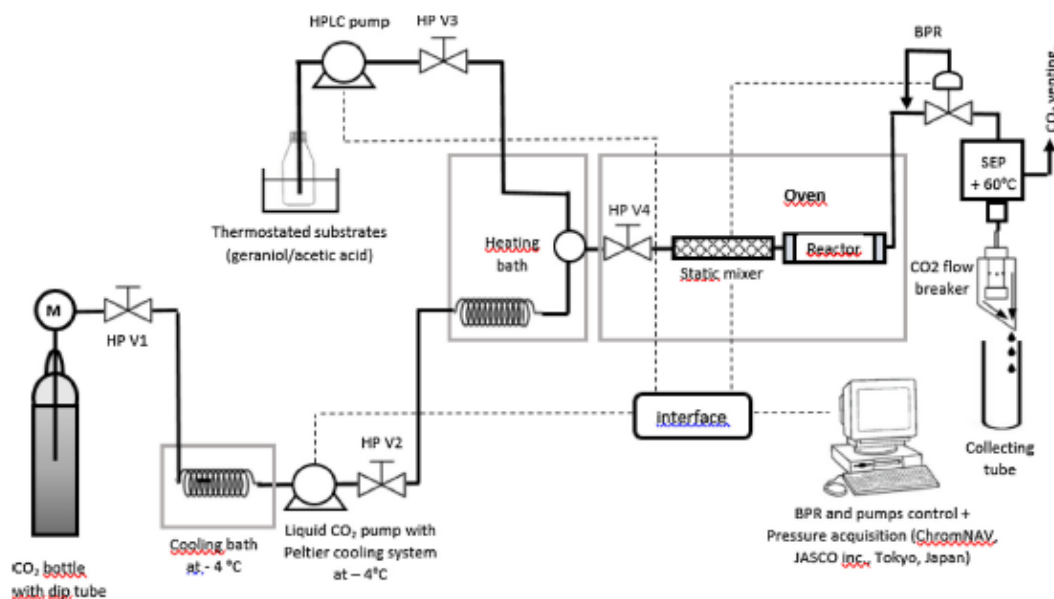


Fig. 1. Schematic view of the supercritical CO<sub>2</sub> equipment. M: manometer, HP V1 to HP V4: high pressure manual valves, BPR: Back Pressure Regulator, SEP: Separator heated at 60 °C with a Peltier system. Solid black lines represent tubing for CO<sub>2</sub> and liquid substrates. Dashed lines represent BPR and pumps control from ChromNAV software.

consisted of a 1/4 in. (6.35/4.6 mm external/internal) diameter \* 65 mm length stainless steel tubing section connected to 1/16 in. tubing with Swagelok VCR adaptors (Solon, Ohio, USA) equipped with stainless steel sintered pieces placed on both extremities of the reactors. For other experiments, we also used a long BPR with a 5 mL internal volume. In this long BPR, the 1/4 in. (6.35/4.6 mm external/internal diameter) tubing section was just 5-fold longer (i.e. 32.5 cm) as compared to the short BPR. Static mixer, BPR and tubing were placed in a Thermo Scientific HERAEUS 200 L ventilated oven (Dreieich, Germany) for temperature regulation with a precision of  $\pm 0.15$  °C of the set CO<sub>2</sub> temperature value. Fig. 1 shows the schematic flow diagram of the extraction equipment. For each reaction run, the BPR was packed with fresh Lipozyme<sup>®</sup>435 adjusted to a water activity of 0.23. A constant flow rate of 40  $\mu$ L/min of an equimolar freshly prepared mixture of geraniol and acetic acid as substrates was systematically mixed with a supercritical CO<sub>2</sub> coming from a 3 mL/min liquid CO<sub>2</sub> pumped at 60 bar and  $-8$  °C as a reference. The substrates concentration based on 3 mL/min liquid CO<sub>2</sub> pumped at 60 bar and  $-8$  °C was always 57 mM, excepted for the study on the influence of the flow-rate (i.e. residence time) on the % conversion. In this case, where we also used 0.5, 1, 4 and 6 mL/min liquid CO<sub>2</sub> flow rates, the substrates concentrations in CO<sub>2</sub> were kept equal to 57 mM (based on the liquid CO<sub>2</sub> flow rates) by adjusting substrates flow-rate accordingly. For each liquid CO<sub>2</sub> flow rate used, real CO<sub>2</sub> flow rates in a supercritical form, as well as corresponding residence times and adjusted substrates concentrations depending on pressure and temperature used (i.e., changes in density) are given in data in brief article.

Products (geranyl acetate and some traces of water) and unreacted substrates (geraniol and acetic acid) were collected in 60 mL amber vials at the exit of the back pressure regulator (BPR). Collecting samples in a reproducible way (expected collected volumes) all along the reaction when suddenly depressurizing CO<sub>2</sub> through the Back Pressure Regulator was observed to be impossible. That is why we designed a home-made CO<sub>2</sub> flow breaker that broke the CO<sub>2</sub> flow while allowing insoluble products and unreacted substrates to flow in a liquid form along the internal walls of the flow breaker. This flow breaker system was placed just above, and not inside the collecting tube, in order that

CO<sub>2</sub> can be easily eliminated in the atmosphere. In this way we were reproducible in our collected volumes and these volumes were in accordance with the pumped substrates volumes. The CO<sub>2</sub> flow breaker was home-made with the barrel of a 10 mL polypropylene syringe whose the slip tip (in central position) was cut. The barrel was diagonally cut with a cutter on the opposite side of the tip. A stainless steel threaded connector for HPLC 1/16 in. tubing was laterally pierced with six 0.2 mm diameter holes at the level of the connection chamber. One side of the connector was stopped with an HPLC screwed peek stopper. The other side of the connector was fixed inside the cut barrel of the syringe with help of a male-male coupler for peek tubing whose one side was screwed in the connector and the other side was passed through a rubber seal and through the hole made by cutting the tip. The other side of the coupler was strongly fixed by screwing a female connector with a 1/16 in. hole. Finally the 1/16 in. stainless steel tubing at the exit of the BPR-separator was passed through the flow breaker prior experimentations. The overall final size of the flow breaker was 5 cm length over 1.2 cm diameter. At the end of each reaction run the system was purged from the residual scCO<sub>2</sub>. The BPR was emptied, disassembled, and its elements were thoroughly washed with distilled water and acetone before drying. Sonication in water was used for the cleaning of sintered stainless steel filters as well as the cleaning of the static mixer.

## 2.5. Experimental design

In order to investigate the impact of pressure and temperature on the geranyl acetate enzymatic synthesis, we used a simple 2 factors 2 levels full factorial design with an additional central point. The three tested temperatures T were 45, 55 and 65 °C, and the three tested pressures P were 150, 225 and 300 bar (central point at 55 °C-225 bar). As explained later, we used operational conditions ensuring mono-phasic conditions (i.e. solubilisation of substrates and products in the supercritical CO<sub>2</sub>). Each of the four corner points combination was tested in triplicate (n = 3) whereas the central point was tested 6 times (n = 6). Therefore,  $4 \times 3 + 6 = 18$  experiments were run. The conversion % of geraniol to geranyl acetate was defined as the amount of



geranyl acetate (mole) found in the collecting tube divided by the amount of geraniol (mole) pumped as a substrate in the system. This conversion % was estimated as  $\hat{C}$  by using a simple linear model with interaction between pressure and temperature, as defined in Eq. (1).

$$\hat{C} = a_1 \cdot P + a_2 \cdot T + a_3 \cdot P \cdot T + a_4 \quad (1)$$

Coefficient  $a_1$  to  $a_4$  were identified by non-linear regression with help of JMP 10 software from SAS institute Inc. (Cary, NC, USA). Response surface and iso-responses curves were built with Matlab software from Mathworks (Natick, USA). The relationship between residence time in the reactor and conversion % was fitted with the Hill equation. The significance of the model and coefficients was estimated with an analysis of variance. Normality of residuals was assessed thanks to a Shapiro-Wilk test performed with XLstat software from Addinsoft (Paris, France).

### 2.6. Standards preparation and calibration curve

Acetic acid, geraniol and geranyl acetate were added to acetone as a solvent, thus giving a standard stock solution at 23.5 mg/mL, 44.5 mg/mL and 45.4 mg/mL, respectively. This stock solution was used as such and diluted 1.5, 2 and 4 times in acetone. 1 mL of each of the 4 standard solutions hence obtained was then completed with 50  $\mu$ L of methyl decanoate as an internal standard. Experimental samples from the collecting tube were diluted 5 times in acetone and 1 mL of the obtained solutions was also completed with 50  $\mu$ L of methyl decanoate as an internal standard. Concentrations in the samples were determined by using the standard curves (peak area of the target molecule/peak area of the internal standard) =  $f$  (unknown concentration of the target molecule/known concentration of the internal standard in the sample).

### 2.7. Limits of detection and quantification

The detection and quantification limits (LOD and LOQ) were determined for all standards according to a US-EPA method [16]. LOD and LOQ were calculated as  $[3 \times s_{a0} / a]$  and  $[10 \times s_{a0} / a]$  respectively, with  $s_{a0}$  and  $a$ , the standard deviation on the intercept and the slope of the calibration curve, respectively.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Steady-state catalytic conditions

Defining the time at which a steady-state conversion is achieved when using a continuous process is one of the key information describing the process. Firstly, 1 h runs at 55 °C and 200 bar (medium density  $scCO_2$ ) were performed in both short (1 mL), and long (5 mL) PBR, the latter containing thus 5-fold more enzyme (1500 mg instead of 300 mg beads as compared to the short PBR). Fig. 2 shows that a steady-state was achieved in the reactor after 15 min in the short reactor and 20 min in the long reactor, likely due to a longer impregnation process of the packed bed with the reaction mixture ( $n = 3$ ). Additional points during the 10 first minutes may have been valuable to identify the exact times, if different, at which the steady states were achieved in both short and long reactors. It can also be seen that, in these conditions, there is no proportionality between the amount of enzyme involved in the process and the conversion rate of geraniol to geranyl acetate. Indeed, using five-fold more enzyme in a five-fold longer reactor just induced an increase from about 45 % to 73 % conversion. Total conversion was never achieved in these conditions. As demonstrated later the hypothesis was that this was due to water accumulation along the packed bed reactor with concomitant increase of the hydrolysis of geranyl acetate to geraniol and acetic acid starting from a given critical water concentration in the reactor mixture somewhere along the PBR. This led to conclude that, in the present experimental conditions, an optimal PBR length between 6.5 cm (6.1 s average residence time of

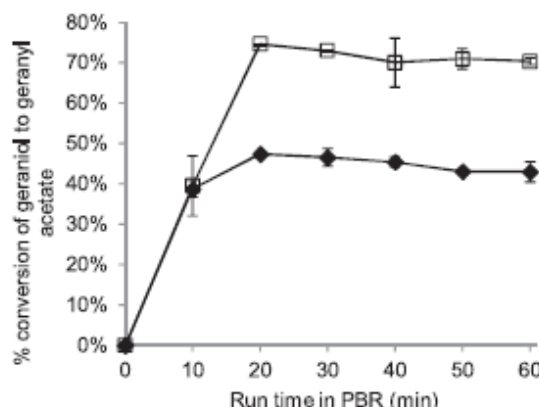


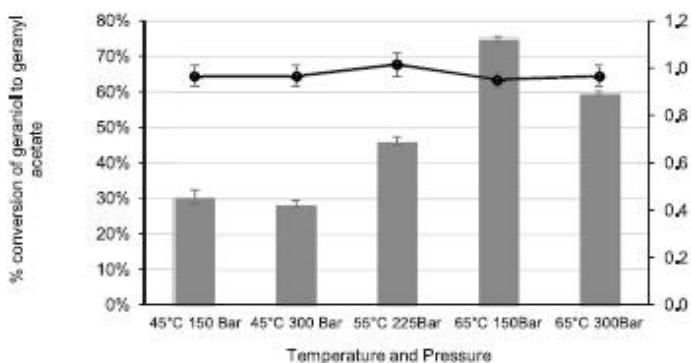
Fig. 2. conversion rate of geraniol to geranyl acetate at 55 °C and 200 bar ( $3 \text{ mL min}^{-1}$  liquid  $CO_2$  pumped at 60 bar and  $-8^\circ\text{C}$ ) versus run time in short (1 mL, 300 mg Lipozyme\*435) and long (5 mL, 1500 mg Lipozyme\*435) PBR. Substrates feeding:  $40 \mu\text{L min}^{-1}$  of an equimolar mixture of acetic acid and geraniol leading to 57 mM based on the  $3 \text{ mL/min}$  of liquid  $CO_2$ . White Squares: long PBR, black Diamonds: short PBR. In order to take into account the decay of  $CO_2$  density when passing from liquid state to supercritical state,  $scCO_2$  flow rates, residence time and corresponding adjusted substrates concentrations in this  $scCO_2$  are given in the data in brief article.

$scCO_2$ ) and 32.5 cm (30.5 s average residence time of  $scCO_2$ ) should be found to avoid the competing hydrolyzing reaction and maximizing the conversion rate. This optimal length would not necessarily guaranty a 100% conversion because the residence time for the said best length choice might then be too short for complete conversion. In order to strengthen the hypothesis of water accumulation, a 30 min run was performed in a long 5 mL PBR filled with 900 mg Lipozyme\*435 mixed with well dried 1480 mg desiccant. A 97% conversion was reached confirming the necessity to limit the water accumulation in the reaction mixture (see Section 3.5).

### 3.2. Geranyl acetate synthesis at various pressure and temperature combinations

From the 1.2 mL of substrates pumped during the 30 min run,  $1.1 \pm 0.1 \text{ mL}$  was collected when adding the volume collected during the run to the residual volume collected after the run during the 30 min drying step. As can be seen in Fig. 3, based on the 1.2 mL of substrates pumped in the short PBR during the 30 min run,  $0.9 \pm 0.1 \text{ mL}$  of geranyl acetate and unreacted substrates was systematically collected, whatever the  $CO_2$  pressure and temperature used in the experimental domain. This showed that the collecting system (SFE Process, France) was efficient. Fig. 3, as well as the surface response and isocontour plot shown in Fig. 4a and b, clearly show that, (i) the higher was the temperature, the higher the conversion rate was, (ii) at a given temperature, and especially at high temperature, the pressure has a clear negative effect on the conversion rate. This negative effect of pressure, especially at high temperature, might be explained by a lower enzyme stability. Also, at 65 °C–150 bar the  $CO_2$  dynamic viscosity is  $42 \times 10^{-6} \text{ Pa s}$ , whereas at 65 °C–300 bar the  $CO_2$  dynamic viscosity increases to  $74 \times 10^{-6} \text{ Pa s}$ . This higher viscosity may lead to a decay in mass transfer in the beads porosity. The best conversion, in the present experimental domain, was achieved at 65 °C–150 bar with  $73.8 \pm 0.9\%$  in 30 min run time (taking into account changes in density between liquid and supercritical  $CO_2$ , the liquid  $CO_2$  pumped at  $3 \text{ mL/min}$  corresponded to a  $scCO_2$  flow rate of  $5.31 \text{ mL/min}$  and to an approximate contact time between the  $scCO_2$  and the packed bed of only 4.5 s during the run, as detailed in data in brief article).

Table 1 lists the table of coefficients for experimental conditions in



**Fig. 3.** Results of the design of experiment. Bar chart represents the conversion rate achieved in each of the Temperature-Pressure conditions. Curve represents the liquid volume collected during the run (1.2 mL substrates volume was pumped during the run). Experimental conditions: Run time of 30 min, 300 mg Lipzyme\*435 beads at  $a_w = 0.23$  in a short PBR, a liquid  $\text{CO}_2$  flow rate of 3 mL/min was used, Substrates feeding:  $40 \mu\text{L min}^{-1}$  of an equimolar mixture of acetic acid and geraniol leading to 57 mM based on 3 mL/min liquid  $\text{CO}_2$  pumped at 60 bar and  $-8^\circ\text{C}$ ,  $n = 3$  except for the central conditions ( $55^\circ\text{C}$ -225 bar) for which  $n = 6$ . In order to take into account the decay of  $\text{CO}_2$  density when passing from liquid state to supercritical state,  $\text{scCO}_2$  flow rates, residence time and corresponding adjusted substrates concentrations in this  $\text{scCO}_2$  are given in the data in brief article.

coded nomenclature (-1 for low level to +1 for high level and 0 for central point).  $R^2 = 0.99$  was achieved and all model parameters were significant. In non-coded experimental conditions, the surface response of Fig. 4a could be drawn with the following equation:

$$\text{Conversion \%} = 2.874 \times T + 0.1861 \times P - 0.004426 \times (T \times P) - 98.38 \quad (2)$$

One could be tempted to use even higher temperatures than  $65^\circ\text{C}$  and/or lower pressure than 150 bar but in this case the  $\text{CO}_2$  would not be dense enough to solubilize the  $40 \mu\text{L/min}$  of equimolar mixture of geraniol and acetic acid. Indeed, according to a preliminary experimental design with temperatures of  $45^\circ\text{C}$ ,  $55^\circ\text{C}$  and  $65^\circ\text{C}$  and pressure of 100 bar, 200 bar and 300 bar (data not shown), showed that the volume recovered during the run at  $65^\circ\text{C}$  and 100 bar in the same condition of flowrate was very low (only 0.5 mL over the 1.2 mL of substrates mixture pumped during the 30 min run). This can be related to the low density of the supercritical  $\text{CO}_2$  in these conditions ( $273 \text{ kg/m}^3$ ), decreasing the solubility of the substrates and in turn generating biphasic conditions with bad volume recovery at the exit of the back pressure regulator separator. An additional 0.5 mL volume of liquid mixture consisting of unreacted substrates and products was then recovered during the 30 min drying step at  $55^\circ\text{C}$  and 200 bar, just after the run. This additional liquid volume corresponded to the insolubilized fraction of substrates (and some products), which was accumulated in the dead volume of the system (static mixer and the PBR itself) during

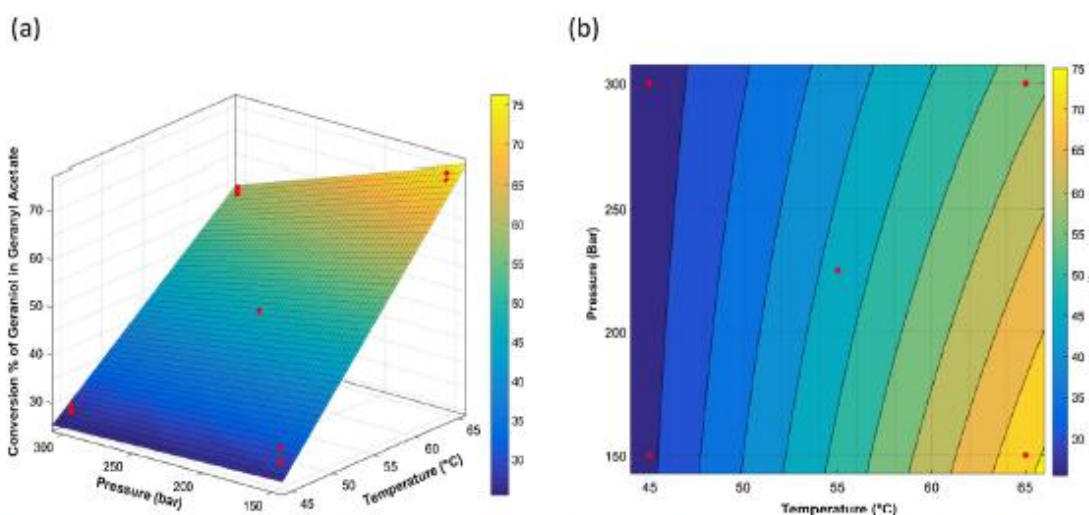
**Table 1**

Estimation of the significant coefficients (based on coded experimental conditions: values between -1 and +1) of a simple linear model with interaction between Pressure and Temperature, in the experimental domain (data generated from SAS JMP).

Coefficients estimations				
Term	Estimation	Standard Error	t ratio	Prob. >  t
Constant-value	46.74667	0.497893	93.89	< 0.0001*
Pressure (150-300 bar)	-4.25	0.609792	-6.97	< 0.0001*
Temperature (45, 65 °C)	18.65	0.609792	30.58	< 0.0001*
Pressure × Temperature	-3.25	0.609792	-5.33	0.0001*

\* Significant coefficient (P-value < 0.05).

the previous run with too low density supercritical  $\text{CO}_2$ . Conversion rate calculated in these conditions were therefore not comparable to conversion results achieved in conditions where substrates were properly solubilized and where products and unreacted substrates were properly collected during the 30 min runs at the exit of the back pressure regulator separator. Besides, the use of temperatures above  $65^\circ\text{C}$  may affect the enzyme stability. In this experimental design, the P-T conditions were chosen depending on the property of the supercritical  $\text{CO}_2$  to solubilize the total amount of the substrates mixture introduced. Consequently, about 80% of the pumped substrates volume was



**Fig. 4.** Surface response (a) and isoresponse curves (b) of geraniol conversion rate to geranyl acetate versus temperature and pressure of supercritical  $\text{CO}_2$  (similar conditions with Fig. 3). Red dot are experimental points (3 at each corner and 6 in the central position) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

recovered in the experimental domain of the DoE, during the run (the residual volume being collected during the purge and partially lost at the exit of the back-pressure regulator separator during the run). With continuous catalytic processes using  $scCO_2$  as a solvent, clear data on this key point should be systematically determined as in case of unsolubilized substrates/products accumulated in the system, the conversion rate may be overestimated if calculated based on analytical data performed on a mixture of volume collected during the run (solubilized fraction) and volume collected during the drying step (unsolubilized fraction). Indeed, in this case the much longer residence time of the unsolubilized fraction in the reactor may lead to a fraction in which more product is found. On the other hand, overestimation may also occur if the measurements are performed on a volume collected during the run, but too far and therefore not representative from the pumped volume of substrates.

These results can be compared to the one of Couto et al [13] who used Novozym<sup>®</sup>435 instead of Lipozyme<sup>®</sup>435. According to the enzyme supplier, Novozym<sup>®</sup>435 is the analytic or technical grade equivalent to Lipozyme<sup>®</sup>435, which is considered as food grade. In both commercial products, the enzyme is CAL B and the enzyme carrier is consisting of macroporous polymetacrylate divinyl benzene beads of around 500  $\mu m$  diameter. This grade difference mainly reflects a higher specific activity in Units/mg of enzyme, about 18% according to [17] in the Novozym<sup>®</sup>435 as compared to the Lipozyme<sup>®</sup>435. But the bulk activity expressed in U/g of beads were found to be nearly the same between both products, that is  $167.1 \pm 0.39$  U/g for Novozym<sup>®</sup>435 and  $173.9 \pm 0.36$  U/g for Lipozyme<sup>®</sup>435. So in brief, the two catalytic preparations are quite similar as claimed by the enzyme supplier. Couto et al. observed around 76% conversion by using 300 mg of Novozym<sup>®</sup>435 at a pressure and temperature of 100 bar and 35 °C, respectively, and a  $CO_2$  flow rate of 0.25 mL/min with 100 mM of each substrate. However, the results of our experimental design performed at 3 mL/min liquid  $CO_2$  flow-rate as a constant basis, clearly showed that Lipozyme<sup>®</sup>435 prefers high temperature, at least in terms of activity, since the best conversion observed was  $73.8 \pm 0.9\%$  at 65 °C-150 bar. These comparable conversion rates achieved at 35 °C by Couto et al. and at 65 °C in our DoE can very likely be explained by the fact that these authors used a  $CO_2$  flow rate twelve folds lower as compared to the one used in our DoE, thus significantly increasing residence time of the reaction mixture in the PBR and therefore contacts between substrates and CALB. They also observed a small benefit in using more than 300 mg of beads certainly due to water accumulation along their PBR (83% with 900 mg at 35 °C). The impact of using lower flow rates (i.e. higher residence times in the PBR) on the conversion rates at 55 °C and 65 °C is described later in this study.

When comparing the amount of geranyl acetate produced per mass unit of catalyst beads and per time unit at 65 °C and 150 bar to the one observed by Couto et al. [13] at 35 °C and 100 bar, it appeared that the production was significantly higher in the present study. Indeed, after

30 min runs and using 300 mg beads equilibrated at 0.23 at 65 °C and 150 bar, 760 mg of geranyl acetate was produced, which corresponds to 5 g geranyl acetate/g beads/h. However, Couto et al. [13], also with 300 mg beads at  $a_w = 0.23$  and in their experimental conditions (12-fold lower flow rate of  $CO_2$ ), produced about 120 mg of geranyl acetate in 30 min, which corresponds to 0.8 g geranyl acetate/g beads/h. So using higher temperature allowed a better valorization of the commercial catalyst by a factor of six despite the slightly lower conversion rate observed in our study (74% instead of 76% for [13]). Differently said, when thinking in terms of geranyl acetate productivity instead of % conversion, it is very likely that the higher temperature used in our study counterbalanced the lower residence time in the PBR inherent to the use of a higher  $CO_2$  flow rate. Seen from a different perspective, Couto et al. obtained 15 mg of geranyl acetate per mL of pumped liquid  $CO_2$  subsequently heated at 35 °C and pressurized at 100 bar, while in our case we obtained 8.4 mg of geranyl acetate per mL of pumped liquid  $CO_2$  subsequently heated at 65 °C and pressurized at 150 bars. Our experimental conditions are therefore more  $CO_2$  consuming but it should be reminded that  $CO_2$  is a cheap consumable and that industrials often recycle it. Besides, working at 65 °C and 150 bar instead of 35 °C and 100 bar, although being most costly, does not represent a real problem since esterification is a neutral reaction in terms of heat consumed or produced. So, once the temperature would be set to 65 °C (or lower), there would be no need for heat release from or heat transfer toward the enzymatic packed bed reactor. Productivity, conversion % and catalyst stability must be the target tryptic. In any cases, the overall cost of the process will have to be evaluated based on consumable costs, process/operational costs (including effluents) and products selling costs. A good balance between productivity, % conversion, catalyst stability and operational costs has to be found. This said, it must be reminded that one key advantage of using biocatalysis for geranyl acetate production in supercritical  $CO_2$  is the lack of effluent together with much softer processing conditions as compared to the chemical pathway.

### 3.3. Catalyst stability

In any biocatalytic process involving enzymes as catalysts, the stability of the latter is of utmost importance because it can significantly affect the cost and convenience of the process by directly impacting the necessity to reload the reactor with fresh enzymes. In this study the stability of the immobilized CAL B was studied by exposing it to (i) six short 30 min runs (i.e. six consecutive pressurization-depressurization cycles) and (ii) one long 22 h run (i.e. only one pressurization-depressurization cycle) with sampling and conversion rate determined about each hour. In this way the stability of the enzyme can be evaluated versus pressurization and depressurization steps, but also versus reaction time. 200 bar and 55 °C conditions were used. As can be seen from Fig. 5a ( $n = 2$ ), after the impregnation step (run 1: about 45% conversion), the stability of the CAL B was excellent with a stable

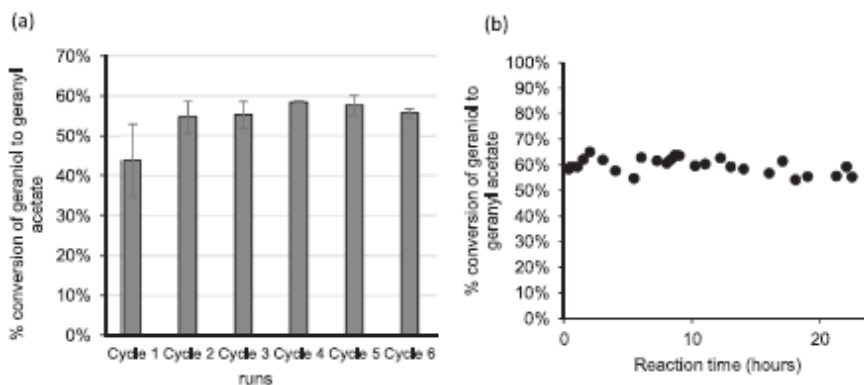


Fig. 5. Stability Tests: (a) seven consecutive short runs of 30 min involving 6 decompression-recompression cycles, (b) one single long 22 h run. Conditions: liquid  $CO_2$  at 60 bar and  $-8$  °C pumped at 3 mL/min before conversion in supercritical  $CO_2$  at 55 °C and 200 bar. Substrates concentration: 57 mM of an equimolar mixture of geraniol and acetic acid based on the 3 mL/min of liquid  $CO_2$ . The PBR was filled with 300 mg of Lipozyme<sup>®</sup>435 beads pre-equilibrated at a water activity of 0.23. In order to take into account the decay of  $CO_2$  density when passing from liquid state to supercritical state,  $scCO_2$  flow rates, residence time and corresponding adjusted substrates concentration in this  $scCO_2$  are given in the data in brief article.

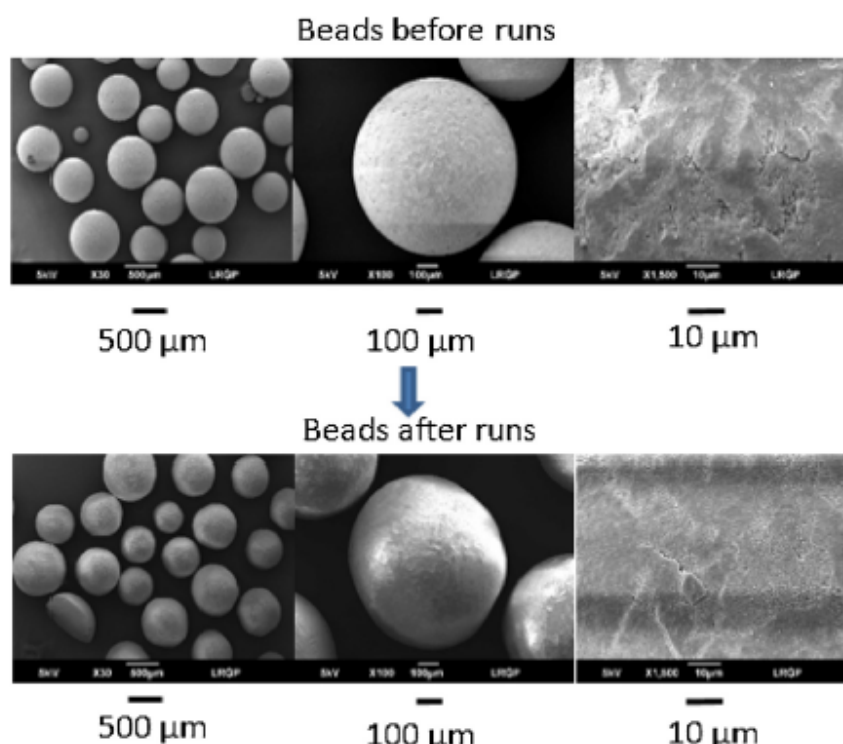


Fig. 6. Scanning Electron Microscopy pictures of Lipozyme\*435 before and after 6 consecutive runs of 30 min using 3 mL/min supercritical CO<sub>2</sub> at 55 °C and 200 bar and 57 mM of an equimolar mixture of geraniol and acetic acid. The PBR was filled with 300 mg of Lipozyme\*435 beads pre-equilibrated at a water activity of 0.23.

conversion rate of about 56%. Fig. 5b demonstrates the high stability of CAL B versus reaction time with an average conversion of about 58% and a decay of about 5% conversion only after 22 h of reaction process. This slight but significant decrease ( $p$  ANOVA = 0.023) was likely due to the fact that 55 °C was high enough to slowly but progressively induce an enzyme inactivation. Couto et al. did not observe any inactivation when working at 35 °C over several days. Finally, a conversion rate of about 56% at 200 bar and 55 °C was obtained whereas (i) about 45% conversion was reached in the design of experiment at 225 bar and 55 °C. A 45% steady-state conversion had also been observed at 200 bar and 55 °C. This 10% difference can be explained (i) by the impregnation step of the PBR (clearly visible in Fig. 5a) keeping in mind that for each 30 min run of the DoE a fresh enzyme loading was used and (ii) by the fact that the steady state in the short reactor was shown to be achieved after about 15 min in our conditions. So in the present Design of Experiments (30 min runs) the conversion rates were logically lower as compared to the ones achieved with repeated or long runs.

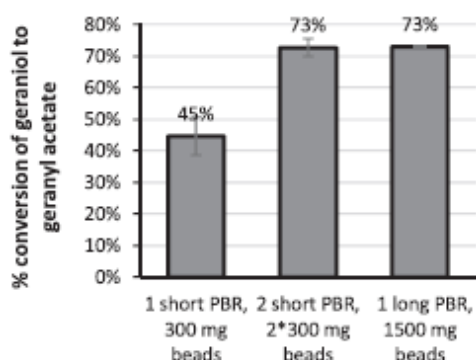
Fig. 6 presents SEM pictures of the Lipozyme\*435 beads before and after the 6 consecutive runs. It can be observed that the beads sphericity was clearly affected by the mechanical stress induced during the 6 consecutive pressurization-depressurization steps of the 6 consecutive runs. But as seen in Fig. 5a, this did not affect the activity. When focusing on the surface aspect of Lipozyme\*435 beads, it can also be observed that their surface appeared to be smoother after the runs.

#### 3.4. Use of two short parallel reactors and comparison with one long reactor

The results clearly showed that there is an interest in searching an appropriate length of PBR (not too short/long) in order to maximize the conversion rate of esterification by avoiding to reach a critical water concentration in the reaction mixture, somewhere in the reactor,

leading to the competing hydrolysis reaction. Using desiccant is not the most convenient approach since it would require, once the desiccant would be saturated in water, to change it with dehydrated desiccant. Instead, aiming to find “the optimal length” in supercritical CO<sub>2</sub> conditions would be more appropriate. In this study, as a starting point, two 1 mL short PBR were used (300 mg Lipozyme\*435 each) in parallel instead of in series and results were compared with the ones observed using the 5 mL long PBR (1500 mg Lipozyme\*435). By this way, the flow rate of scCO<sub>2</sub> was divided by 2. In our case, for the two short PBRs in parallel, the 3 mL/min of liquid CO<sub>2</sub> pumped corresponded to a global flow rate of 3.94 mL/min of supercritical CO<sub>2</sub> at 55 °C and 200 bar. This flow rate was equally divided between the two short PBR in which residence time of scCO<sub>2</sub> was 12 s as detailed in data in brief article. The scCO<sub>2</sub> residence time in the 5 mL long PBR was calculated as 30 s. Using two short reactors in parallel came down to a 2 mL short reactor with a double internal diameter. Two reactors in series were not used to mimic an intermediate size reactor because a too long reactor size may have led to hydrolysis reaction that has to be avoided.

Fig. 7 shows that, thanks to the use of two short reactors in parallel (i.e.  $2 \times 300 = 600$  mg of Lipozyme\*435), at 55 °C and 200 bar, it was possible to achieve an equivalent conversion rate ( $73.0 \pm 3.0\%$ ) as compared to the  $73.0 \pm 0.1\%$  conversion achieved with the single long PBR (1500 mg of Lipozyme\*435). In other words, using 2.5 fold less enzyme, the same conversion rate was achieved. Furthermore, using two short reactors in PBR did not allow to achieve exactly twice the conversion rate achieved with one single PBR (about  $45\% \times 2 = 90\%$ ). This 73% conversion rate can be due to slower impregnation step in each short PBR due to the twice lower CO<sub>2</sub> flow rate in each parallel reactor. These results indicated the way to follow in terms of process intensification.

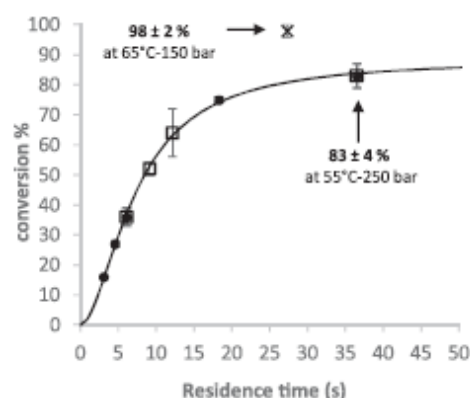


**Fig. 7.** Effect of the reactors configuration (one short PBR in parallel, 1 long PBR) on the conversion rate of geraniol to geranyl acetate. Experimental conditions: 30 min runs using liquid CO<sub>2</sub> at 60 bar and -8 °C pumped at 3 mL/min before conversion in supercritical CO<sub>2</sub> at 55 °C and 200 bar. Substrates concentration: 57 mM of an equimolar mixture of geraniol and acetic acid based on CO<sub>2</sub> in liquid state. In order to take into account the decay of CO<sub>2</sub> density when passing from liquid state to supercritical state, scCO<sub>2</sub> flow rates, residence times and corresponding adjusted substrates concentrations in this scCO<sub>2</sub> are given in the data in brief article.

### 3.5. Influence of CO<sub>2</sub> flow-rate on the reaction

Couto et al. (13) showed that lower conversion rates were achieved when increasing scCO<sub>2</sub> flow rate (i.e. decreasing residence time) from 0.25 mL/min to 0.5 mL/min and 1 mL/min, in their experimental conditions. In order to evaluate the impact of CO<sub>2</sub> flow rate (i.e. residence time) on the conversion rate of geraniol to geranyl acetate, in this study, five runs were performed with one single short 1 mL PBR filled with 300 mg Lipzyme\*435 beads using pumped liquid CO<sub>2</sub> flow rates of 0.5, 1, 3, 4 and 6 mL/min. After conversion to supercritical CO<sub>2</sub> at 55 °C and 200 bar, corresponding flow rates of scCO<sub>2</sub> of 0.66, 1.31, 3.94, 5.26 and 7.89 mL/min were achieved. Based on a void fraction of 40% in the PBR, these scCO<sub>2</sub> flow rates corresponded to residence times, Rt, in the short PBR of 36.5, 18.3, 6.1, 4.6 and 3.0 s, respectively. Four additional runs were also performed with 2 short 1 mL PBR in parallel. Each one was filled with 300 mg Lipzyme\*435 beads (i.e. 600 mg beads used as a total mass) at different scCO<sub>2</sub> flow rates. Liquid CO<sub>2</sub> flow rates of 1, 3, 4 and 6 mL/min were used. After conversion to supercritical CO<sub>2</sub> at 55 °C and 200 bar and division by 2, corresponding flow rates of scCO<sub>2</sub> of 0.66, 1.97, 2.63 and 3.94 mL/min were achieved, respectively. Based on a void fraction of 40% in the PBR, these scCO<sub>2</sub> flow rates corresponded to residence times in each of the two short PBRs of 36.5, 12.2, 9.1 and 6.1 s, respectively. Geraniol and acetic acid flows were adapted accordingly in order to keep an equimolar concentration of 57 mM of each substrate in CO<sub>2</sub> (based on the liquid CO<sub>2</sub> flow rate). In any case, the collected volumes were in accordance with anticipated ones at the exit of the back-pressure regulator separator. For convenience, Fig. 8 summarizes all the collected conversion rates versus residence times Rt.

Focusing on results achieved with one single short PBR, it can be observed that, the higher the residence time (i.e. the lower the flow-rate) was, the higher the conversion rate was, which was in accordance with a greater contact time between lipases and substrates in the reactor. Despite a significant improvement of the conversion rate, total conversion was not achieved, even at 36.5 s Rt where 83 ± 4% conversion was obtained. Similar observation can be made with two PBR in parallel. In this case, using two PBR in parallel configuration fed with a flowrate of 6 mL/min (Rt of 6.1 s in each PBR) led to the same 37 ± 3% conversion as the one observed with one single PBR at a flowrate of 3 mL/min (Rt of 6.1 s too). Similarly, using two PBR in parallel configuration fed with a flowrate of 1 mL/min (Rt also equal to 36.5 s in each PBR) led to the same 83% conversion as the one observed with one single PBR at a flowrate of 0.5 mL/min (Rt of 36.5 s too). But



**Fig. 8.** Influence of supercritical CO<sub>2</sub> residence time (i.e. of scCO<sub>2</sub> flow-rate) on the conversion rate of geraniol to geranyl acetate. Here, changes in CO<sub>2</sub> density when passing from liquid state to supercritical state have been used to calculate the real flow rates and corresponding residence times of supercritical CO<sub>2</sub>, as explained in data in brief article. (●) represent runs carried-out in one single short PBR containing 300 mg Lipzyme\*435 beads, (□) represent runs carried-out in two short PBR in parallel (i.e. using 2 × 300 = 600 mg Lipzyme\*435 beads). Experimental conditions: supercritical CO<sub>2</sub> at 55 °C and 200 bar. Geraniol and acetic acid concentrations were kept to 57 mM based on the liquid CO<sub>2</sub> pumped. Additional x marker represents runs carried-out in one single PBR containing 300 mg Lipzyme\*435 beads with a supercritical CO<sub>2</sub> at 65 °C and 150 bar at 27 s residence time (0.5 mL/min liquid CO<sub>2</sub>) with 57 mM of each substrates too, based on the liquid CO<sub>2</sub> pumped. Runs were performed in triplicates.

of course, in these two last cases, the amount of produced geranyl acetate is the double of the one achieved with one single PBR. These observations clearly demonstrate that there is no external transfer limitations of substrates, likely due to very low viscosity of scCO<sub>2</sub> as a reaction solvent.

In order to fit the sigmoid profile of these experimental data, an Hill-like equation appeared as appropriate although lipases are generally not considered as allosteric enzymes, even if some exceptions exist [18]. The Hill equation, defined in 1910 by Hill for modeling the binding of oxygen to haemoglobin, is widely used in the context of allosteric enzymes. In multimeric allosteric proteins, the binding of substrate at the active site in one subunit affects the binding of the substrate at the active site in another subunit (homotropic cooperativity). Alternatively, the substrate can interact with the enzyme at a site other than the active site (heterotropic cooperativity). We kept the form of the Hill equation but only changed substrates concentrations with Residence time, Rt, and V<sub>0</sub> and V<sub>max</sub> with conversion rate and theoretical maximum achievable conversion rate, respectively. The equation appears as follows

$$Conv = \frac{Conv_{max} \cdot Rt^n}{Rt_{0.5}^n + Rt^n} \quad (3)$$

Where  $Conv_{max}$ , represents the theoretical maximum achievable conversion rate for an infinite residence time Rt,  $Rt_{0.5}$  represents the residence time leading to half of  $Conv_{max}$ , and n represents a coefficient (in the Hill equation,  $n > 1$  indicates a cooperative binding and  $n < 1$  indicates a negative cooperative binding). When  $n = 1$ , Eq. (3) becomes similar in its form to the Michaelis-Menten one. The non-linear fitting resulted in a R<sup>2</sup> of 0.999 and in values expressed with their 95% confidence interval.  $Conv_{max}$  value was found to be 88.5 ± 3.9%. The  $Rt_{0.5}$  value was found to be 7.3 ± 0.5 s, and n was found to be 1.8 ± 0.2. As said above, and although lipases are generally not considered as allosteric enzymes, it is interesting to see that n is significantly higher than 1, which may reflect a clear cooperativity at the level of the unique active site of the lipase. If so, this cooperativity would then be in

accordance with the well-known bi-bi ping-pong catalytic process of CAL B involving two substrates (acyl donor and acyl receptor) not simultaneously entering in the active site. One key information of this fitting was that using a very low flow-rate leading to a very long residence time would likely never allow to reach more than  $88.5 \pm 3.9\%$  conversion of geraniol to geranyl acetate in the present experimental conditions. A reason for that might be that, like in a chromatographic column, substrates dissolved in the  $scCO_2$  may interact differently with the surfaces of the beads in the packed bed, leading to a molar ratio along the bed different from 1, and therefore to the exit of unreacted substrates. The establishment of a thermodynamic equilibrium, well known with esterification reactions especially in batch reaction, may also be considered as an explanation. The fact that the purity of the geraniol used was “only” 98% may also be a reason slightly explaining the non-achievement of a 100% conversion. Based on the results of the design of experiment and on the data collected on the positive impact of the residence time, catalytic runs were performed at  $65^\circ C$ -150 bar and 0.5 mL.min with a single 1 mL PBR. The substrates concentrations were kept to 57 mM based on liquid  $CO_2$  flow-rate. The residence time of  $scCO_2$  was then 36.5 s in the reactor and, thanks to the higher temperature and to the lower pressure, a conversion rate of  $98 \pm 2\%$  was finally obtained. This came down to produce 1.1 g of geranyl acetate (purity  $98 \pm 2\%$ ) per gram of Lipozyme\*435 beads and per hour. When extrapolating to an industrial scale reactor of 100 kg catalyst beads, 2.64 t of 98% purity and solvent-free geranyl acetate may then be biochemically produced per 24 h under steady-state conditions, provided no scale-up limitations appear. One key advantage of supercritical  $CO_2$  is that, thanks to its very low viscosity and high diffusivity, no external, and likely also no internal transfer limitations occur between and within beads, respectively. Upscaling should then be easy to undertake.

#### 4. Conclusion

In the experimental domain of the present study, Lipozyme\*435 showed the best activity at  $65^\circ C$  (highest temperature) and 150 bar (lowest pressure) with a negative effect of pressure, especially at high temperature. In these conditions a  $73.8 \pm 0.9\%$  conversion was achieved, which corresponds to about 5 g geranyl acetate / g Lipozyme\*435 beads/h. A response surface was established in the range 150–300 bar and 45–65  $^\circ C$ , based on a simple full factorial design with an additional central point. This surface could be accurately based on a linear model with interaction between pressure and temperature. Good stability of the lipase was observed at  $55^\circ C$ -200 bar after 6 consecutive short 30 min runs and also after a 22-h single run. Changes in beads sphericity and surface after several runs were not reflected by any impact on the conversion rate, thus showing that there was no enzyme leaching from the beads nor enzyme inactivations over the repeated runs. Conversion rate observed at  $55^\circ C$ -200 bar with a single short PBR (300 mg Lipozyme\*435 beads) and with a 5-fold longer PBR (1500 mg Lipozyme\*435 beads) were 45% and 73%, respectively. Full conversion was not achieved using long PBR due to water accumulation and subsequent competitive hydrolysis along the fixed bed. Steady-state conversions were observed after 10 min and 20 min in short PBR and long PBR, respectively. In order to face the problem of water accumulation, the use of a two-short parallel PBR configuration (2\*300 mg Lipozyme\*435 beads) led to  $73.0 \pm 3.0\%$  conversion thus showing that it was possible to obtain similar conversion rate using 2.5 time less enzyme as compared to the long PBR (600 mg instead of 1500 mg beads). This example showed that, by choosing a reactor configuration avoiding critical water accumulation in the PBR under steady-state conditions (i.e. a water concentration shifting the reaction equilibrium mainly toward hydrolysis instead of esterification) it is possible to achieve better catalytic performances. Finally, at  $55^\circ C$  and 200 bar, the data obtained from the study of the impact of the residence time (i.e.

flow rate) on the conversion rate of geraniol to geranyl acetate could be properly fitted by the Hill equation. This revealed that, at 57 mM of each substrates based on the liquid  $CO_2$  flow-rate, a maximum conversion of  $88.4 \pm 3.8\%$  can be achieved for very long residence times. Results finally led to use a 36.5 s residence time of  $scCO_2$  at  $65^\circ C$  and 150 bar in one short 1 mL PBR. A  $98 \pm 2\%$  conversion rate was obtained corresponding to 1.1 g of  $98 \pm 2\%$  purity geranyl acetate per g of catalyst beads and per hour. Keeping in mind that enzymatic esterification in  $scCO_2$  does not generate any side and toxic effluent as compared to chemical acylation processes, these results should be considered with interest in the perspective of an industrial, biochemical and eco-friendly production of a solvent-free and “green labelled” geranyl acetate from equimolar acetic acid and geraniol mixtures. Results from this study may also be successfully used for the green synthesis of other terpene esters in supercritical  $CO_2$  using lipases.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by the ANR (French National Agency for Research) through the project ISEAPIM3 (ANR-15-CE07-0023). We thank Ramiro Martinez (Novozymes Espana, S.A.) for the gift of Lipozyme\*435. We also thank Jeremy Lagrue (SFE Process) for his support in designing the  $CO_2$  flow breaker used in this study.

#### References

- [1] H. Surburg, J. Panten, Individual fragrance and flavor materials, acyclic terpenes, acids and esters, in: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co (Ed.), Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses, 5th edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2006, pp. 45–49.
- [2] K.J. Liu, Y.R. Huang, Lipase-catalyzed production of a bioactive terpene ester in supercritical carbon dioxide, *J. Biotechnol.* 146 (2010) 215–220.
- [3] E. Hodaj-Celliku, O. Tsiftoglou, I. Shuka, S. Abazi, D. Hadjipavlou-Litina, D. Lazari, Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of some aromatic and medicinal plants from Albania, *Nat. Prod. Commun.* 12 (2017) 785–790.
- [4] M. Zanetti, T.K. Carmiel, Al. Valério, J.V. de Oliveira, D. de Oliveira, P.H.H. de Araújo, H. Gracher Riellac, M.A. Fiori, Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92 (2017) 115–121.
- [5] M.A. Elgndi, S. Filip, B. Pavić, J. Vladić, T. Stanojković, Ž. Žitak, Z. Zeković, Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction, *J. Supercrit. Fluids* 128 (2017) 128–137.
- [6] BGC Research, Report Overview in: BGC Research Chemical Report, Global Markets for Flavors and Fragrances, Report ID: CHM034E, (2016), pp. 1–2.
- [7] Ambersing P. Rajput, Rambhan P. Gore, N-Acylation in non-aqueous and aqueous medium- method of amide in non-peptide compounds, *Der Pharma Chemica* 3 (2011) 409–421.
- [8] A. Larios, H.S. Garcia, R.M. Oliart, Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida Antarctica* lipase, *Appl. Microb. Biotechnol.* 65 (2004) 373–376.
- [9] S. Pooja, K.S. Dवेश, S.N. Naik, Synthesis of food flavors by enzymatic esterification process, *USR* 3 (2014) 2113–2116.
- [10] A. Zaik, A.M. Klibanov, Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 3192–3196.
- [11] W. Chulalakasanankul, J.-S. Condoret, D. Combes, Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 691–698.
- [12] C. Peres, M.D.R. Gomes da Silva, S. Barreiros, Water activity effects on geranyl acetate synthesis catalyzed by novozym in supercritical ethane and in supercritical carbon dioxide, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1884–1888.
- [13] R. Couto, P. Vidinha, C. Peres, A.S. Ribeiro, O. Ferreira, M.V. Oliveira, E.A. Macedo, J.M. Loureiro, S. Barreiros, Geranyl acetate synthesis in a packed-bed reactor catalyzed by novozym in supercritical carbon dioxide and in supercritical ethane, *Ind. Eng. Chem. Res.* 50 (2011) 1938–1946.
- [14] P. dos Santos, M.A.A. Meireles, J. Martínez, Production of isoamyl acetate by enzymatic reactions in batch and packed-bed reactors with supercritical  $CO_2$ , *J. Supercrit. Fluids* 127 (2017) 71–80.
- [15] L. Greenspan, Humidity fixed-points of binary saturated aqueous-solutions, *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. - Phys. Chem.* 81 (1977) 89–96.
- [16] A. Hubaux, G. Vos, Decision and detection limits for linear calibration curves, *Anal. Chem.* 42 (1970) 849.
- [17] P. dos Santos, G.L. Zabet, M.A.A. Meireles, M.A. Mazutti, J. Martínez, Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide, *Biochem. Eng. J.* 114 (2016) 1–9.
- [18] J. Köhler, B. Wünsch, The allosteric modulation of lipases and its possible biological relevance, *Theor. Biol. Med. Model.* 4 (2007) 34.



Contents lists available at ScienceDirect

Catalysis Today

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cattod](http://www.elsevier.com/locate/cattod)

## Non-covalent and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on chemically modified multiwalled carbon nanotubes for a green acylation process in supercritical CO<sub>2</sub>



Mohamed Chafik Bourkaib<sup>a</sup>, Yann Guivarc'h<sup>a</sup>, Isabelle Chevalot<sup>a</sup>, Stéphane Delaunay<sup>a</sup>, Jérôme Gleize<sup>b</sup>, Jaafar Ghanbaja<sup>c</sup>, Fabrice Valsaque<sup>c</sup>, Nawal Berrada<sup>c</sup>, Alexandre Desforges<sup>c</sup>, Brigitte Vigolo<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, University of Lorraine, CNRS, F-54000 Nancy, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Chimie Physique-Approche Multi-échelle de Milieux Complexes, University of Lorraine, F-57078, Metz, France

<sup>c</sup> Institut Jean Lamour, University of Lorraine, CNRS, F-54000 Nancy, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lipase immobilization  
Carbon nanotubes  
Supercritical CO<sub>2</sub>  
Green solvent  
Interactions

### ABSTRACT

*Candida antarctica* B lipase (CAL-B) was immobilized on purified and functionalized multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs). Both immobilization routes, physical adsorption and covalent bonding, were investigated. MWCNT functionalization by a non-aggressive oxidation by potassium permanganate led to an interesting balance between the hydrophilic and the hydrophobic areas of the MWCNT surface; the former being responsible of the good dispersion of MWCNTs in water and the latter having a favorable affinity with CAL-B. The enzyme loadings reached were significant: around 16 wt. % and 21 wt. % for non-covalent and covalent immobilization, respectively. The enzymatic activity was studied with the reaction of O-acylation of geraniol into geranyl acetate by CAL-B in supercritical CO<sub>2</sub>. Even if a decay in synthesis of geranyl acetate was observed over cycling for both CAL-B@MWCNT catalysts, it was demonstrated that the regioselectivity of CAL-B was unchanged through immobilization on the MWCNT surface for both routes. Interestingly, it was shown that a fully green enzymatic process can be achieved with these prepared CAL-B@MWCNT biocatalyst. Such approach could be transferred to other support/enzyme systems for developing new eco-friendly synthesis processes.

### 1. Introduction

Environmental pollution is one of the greatest problems that the world is facing today. Chemical industry belongs to the main sectors that have started to use and currently continue to look for processes capable of reducing contaminant release. In the academic domain, development of greener chemical methods has focused a growing attention recently and remains challenging. Enzymatic catalysis is an interesting route which is compatible with development of fully environmentally friendly processes. Nevertheless, as the enzymes are free, their activity is usually disappointing. Interestingly, improvement of enzymatic conversions can be achieved by immobilizing them onto a support material surface [1]. Selecting an appropriate substrate and inducing favorable enzyme/substrate interactions are both crucial to prepare effective biocatalysts. The immobilization technique has been explored with great success since the immobilized enzymes have shown improved thermal and pH stability and capacity of being reused [1,2].

Compared to high porosity macroscopic materials, nanomaterials having large surface-to-volume ratio and high accessible external surface could avoid diffusion limitation of the reactants to the enzyme sites. Carbon nanotubes (CNTs) are considered as ideal nanomaterials for enzyme immobilization since they mainly offer high external surface, with a cylindrical geometry favorable to a high immobilization level and they have also superior mechanical and conductive properties [3]. Furthermore, CNTs can be easily chemically functionalized by diverse functional groups which offer the potential to use this nanomaterial for both non-covalent [4] and covalent [5] immobilization. CNTs have been shown to increase stability of *Candida antarctica* B lipase (CAL-B) [6]. Physically immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on chemically modified CNTs resulted in significant enhancement of enzyme activity [7]. Phenylalanine ammonia-lyase covalently immobilized on carboxylated CNTs showed improved properties in continuous flow [8].

Lipases such as CAL-B are a widely known as a useful family of

\* Corresponding author.

E-mail address: [brigitte.vigolo@univ-lorraine.fr](mailto:brigitte.vigolo@univ-lorraine.fr) (B. Vigolo).

<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.08.046>

Received 4 June 2019; Received in revised form 22 August 2019; Accepted 27 August 2019

Available online 28 August 2019

0920-5861 / © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

enzymes since they are capable of transferring the acyl group in organic solvents [9], in solvent-free reaction [10,11] or in ionic liquid [12,13]. Few studies reported esterification by CAL-B immobilized on CNTs and for all of them, organic solvents were required for the catalytic synthesis [4,14,15]. More recently, the unique properties of supercritical fluids (scFs) which are also a kind of green solvents, have drawn the attention of chemists. *Candida rugosa* lipase (CRL) was able to synthesize *trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol with high enantioselectivity in glucopyranoside in supercritical CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>) [16]. CRL was shown to catalyze the regioselective acylation of methyl 6-O-trityl β-D-glucopyranoside in scCO<sub>2</sub> with a conversion rate as high as 91.4% [17]. Conversions of 83% and 98% were observed for the synthesis of geranyl acetate catalyzed by CAL-B in scCO<sub>2</sub> [18]. Even if more investigation is needed to better understand the precise involved mechanisms between the scFs and the biocatalyst, it has been normally observed that the reaction selectivity was preserved and the reaction rate was increased in scFs compared to other solvents. Moreover, the straightforward product collection without any traces of solvent is another advantage of working in scFs [19].

In this work, for the first time, the combination of the advantages of using multiwalled CNTs (MWCNTs) as support and scCO<sub>2</sub> as solvent was proposed for the synthesis of geranyl acetate catalyzed by CAL-B. Geranyl acetate belongs to the family of monoterpene esters being of great interest in cosmetics, pharmaceuticals and food industry for their properties of floral scents and antibacterial effects. CNTs were chemically modified to increase their affinity with water. Both physical adsorption and covalent immobilization by amino-acid coupling were investigated. Thanks to a set of complementary techniques, the preparation of the biocatalysts was fully controlled. Acylation reaction of lysine by CAL-B@MWCNT was also carried out to check any modification of reaction selectivity for both types of immobilization on CNTs. Enzymatic synthesis of geranyl acetate was performed both by non-covalent and covalent immobilization of CAL-B onto MWCNT surface in scCO<sub>2</sub>. The conversion rate was discussed in light of the possible interactions involved in the investigated systems.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sample preparation

Potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>) and sodium sulfite (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) were purchased from Alfa Aesar, sodium hydroxide (NaOH) from VWR, and nitric acid (HNO<sub>3</sub>) 65% was acquired from Honeywell Fluka. Sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 95–97 % and hydrochloric acid (HCl) 37% were provided by Sigma Aldrich.

#### 2.1.1. Functionalization of carbon nanotubes

The used MWCNT sample was provided by Nanocyl S.A (NC7000). It was synthesized by a Chemical Vapor Deposition (CVD) method by using iron or cobalt as catalysts deposited on an alumina substrate. The as-produced or raw MWCNTs referred to as rMWCNT contained catalytic residues. For the selective removal of the metal-based impurities, rMWCNT was submitted to a chlorine-based treatment [20] at 1000 °C for 2 h. The purified MWCNTs were named pMWCNT. They were functionalized following a liquid phase method using an alkaline solution of KMnO<sub>4</sub> [21,22]. Typically, 100 mg of the purified MWCNT powder were added to 60 mL of KMnO<sub>4</sub> 0.2 M and 60 mL of NaOH 0.2 M in a round bottom flask equipped with a condenser and refluxed for 40 min. After cooling down 3 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> was added to reduce KMnO<sub>4</sub> in 35 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Then, the powder was washed with HCl 4 N and with water several times until neutral pH. And the sample was dried overnight at 50 °C. The functionalized MWCNTs were referred to as fMWCNT.

#### 2.1.2. Immobilization of CAL-B on the functionalized CNTs

For immobilization, an aqueous dispersion of 0.1 wt.% of fMWCNT

was prepared using an ultrasonic probe Vibra cell 75042 during 15 min with a power of 125 W with a pulse mode 2 s-ON/1 s-OFF. The quality of the dispersion was verified by optical microscopy. The desired amount of CAL-B was added to set the CAL-B / fMWCNT weight ratio to 30%.

For the non-covalent route (ncCAL-B@MWCNT), the mixture CAL-B and fMWCNT was stirred during the chosen duration in the 30 min – 3 h range. A fixed volume of the mixture was taken at regular intervals at every 30 min of immobilization and filtrates on a PTFE membrane. The optimized immobilization duration was determined by two methods:

i) UV–vis spectroscopy (by using a spectrometer Varian Cary 3E) by measuring the concentration of the non-adsorbed CAL-B in the filtrate for each sampling: by using a calibration curve with solutions of BSA (Bovine Serum Albumine) at known concentrations, the CAL-B assay was performed using a commercial Bicinchoninic Acid Assay (BCA) protein measurement kit. It contained a complexing agent which made it possible to reveal the presence of enzymes by a coloration in the visible spectral domain at 562 nm.

ii) TGA under He (see also below): after filtration, the solid CAL-B@MWCNT was dried and transferred into the TGA chamber. It was heated under helium (following the conditions given in Section 2.2). MWCNTs were untouched under inert gas in the used temperature range (RT–900 °C) while the functional groups and the enzymes were gasified. Subtracting the weight loss of the CAL-B@MWCNT to that of the fMWCNT was used to determine the weight corresponding to the amount of adsorbed enzymes [23].

The used covalent immobilization method was based on an amino-acid coupling. In a typical experiment, 300 mg of fMWCNT were dispersed in 600 mL of deionized water (DIW) and the pH was adjusted to 8 with NaOH. 4.8 g of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), 4.8 g of (*N*-Hydroxysuccinimide) NHS and 100 mg of enzymes were added to the fMWCNT dispersion. The reaction was conducted at room temperature under stirring for 48 h. The prepared CAL-B covalently immobilized on MWCNTs (cCAL-B@MWCNT) were washed 3 times with DIW on a vacuum filtration set-up and dried by freeze-drying.

#### 2.1.3. Activity assays of the prepared CAL-B@MWCNT

2.1.3.1. *Chemicals and enzyme.* Lysine and lauric acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and 2-Methyl-2-butanol (M2B2) from Carlo Erba (France). The free lipase B of *Candida antarctica* (CAL-B) was kindly provided by Novozymes. Novozym 435® (CAL-B immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU g<sup>-1</sup> and protein grade of 1–10% was purchased from Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Denmark).

2.1.3.2. *Geranyl acetate synthesis.* Geranyl acetate enzymatic synthesis with CAL-B@MWCNT was conducted through a packed bed reactor (PBR) by using a continuous automated high-pressure supercritical fluid equipment (SFC-CO<sub>2</sub>) from JASCO (Tokyo, Japan) (Fig. 1). This equipment consisted in a CO<sub>2</sub> pump (Pu-2080- CO<sub>2</sub> Plus unit, JASCO, Japan) and a semi-micro HPLC pump for the two reaction substrates mixed together (Pu-2085 Plus unit, JASCO, Japan). The liquid CO<sub>2</sub> pump was equipped with an internal Peltier cooling system for cooling at -4 °C. In order to be sure that all CO<sub>2</sub> coming from the CO<sub>2</sub> bottle was in the liquid form, before pumping by the CO<sub>2</sub> pump, an additional cooling of CO<sub>2</sub> at -4 °C was performed with a Lauda RM6 cryostat (Lauda-Königshofen, Germany). The pressure was controlled with an automated back-pressure regulator (BP-2085 Plus unit, JASCO, Japan) at a precision of ±0.2 MPa of the setting value. This back pressure regulator (BPR) is based on the use of a CO<sub>2</sub> flow-switching valve (FSV) mechanism that enables stable system pressure control together with efficient collection of the SFE extract in a glass tube. Because CO<sub>2</sub> decompression is highly endothermic (Joule-Thomson effect), especially when using “high” CO<sub>2</sub> mass flow, and can generate CO<sub>2</sub> dry ice at the exit of the BPR, the latter was equipped with an internal



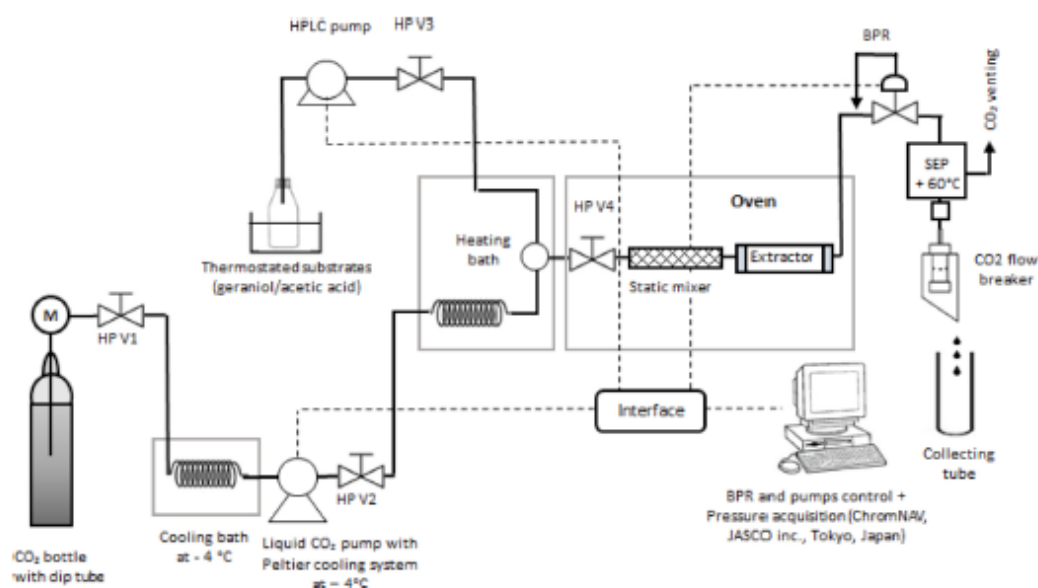


Fig. 1. Schematic view of the supercritical CO<sub>2</sub> equipment. M: manometer, HP V1 to HP V4: high pressure manual valves, BPR: Back Pressure Regulator, SEP: Separator heated at 60 °C with a Peltier system. Solid black lines represent tubing for CO<sub>2</sub> and liquid substrates. Dashed lines represent BPR and pumps control from ChromNAV software.

Peltier heating system maintained at 60 °C in order to avoid CO<sub>2</sub> solidification during decompression. A 30 mm length x 4.6 mm diameter Sulzer SMX™ stainless steel static mixer (Winterhur, Switzerland) was used for mixing scCO<sub>2</sub> and substrates before their entrance in the packed bed reactor (PBR). This PBR consisted of a 1/4 inch (6.35/4.6 mm external/internal) diameter \* 65 mm length stainless steel tubing section connected to 1/16 inch tubing with Swagelok VCR adaptors (Solon, Ohio, USA) equipped with stainless steel sintered pieces placed on both extremities of the reactors. Static mixer, PBR and tubing were placed in a Thermo Scientific HERAEUS 200 L ventilated oven (Dreieich, Germany) for temperature regulation with a precision of ±0.15 °C of the set scCO<sub>2</sub> temperature value. Fig. 1 shows the schematic flow diagram of the extraction equipment. For each reaction run, the PBR was packed with CAL-B@MWCNT adjusted to a water activity of about 0.2. A constant flow rate of 40 μL/min of an equimolar freshly prepared mixture of geraniol and acetic acid as substrates was systematically mixed to a liquid CO<sub>2</sub> at -4 °C pumped at constant flow rate of 3 mL/min and pressure of 200 bars. After heating to 55 °C, the CO<sub>2</sub> became supercritical and expanded in such a way that the volume flow-rate became 3.94 mL/min and its corresponding residence time in the reactor was about 6 s. Substrates concentration in liquid CO<sub>2</sub> was 57 mM, which corresponded to 43.4 mM in scCO<sub>2</sub>. Products (geranyl acetate and some traces of water) and unreacted substrates (geraniol and acetic acid) were collected in 60 mL amber vials at the exit of the back pressure regulator (BPR). For sample collection at atmospheric pressure all along the reaction, and as described in Bourkaib et al. a home-made CO<sub>2</sub> flow breaker was used for breaking CO<sub>2</sub> flow while allowing desolubilized products and unreacted substrates to flow in a liquid form along the internal walls of the flow breaker [18]. This flow breaker system was placed just above, and not inside the collecting tube, so that CO<sub>2</sub> can be easily eliminated in the atmosphere. At the end of each reaction run the system was purged from the residual scCO<sub>2</sub>. The PBR was emptied, disassembled, and its elements were thoroughly washed with distilled water and acetone before drying. Sonication in water was used for the cleaning of sintered stainless-steel filters and static mixer.

**2.1.3.3. Lauroyl-lysine synthesis.** The synthesis of lauroyl-lysine was carried out with L-lysine (0.12 M) and Lauric acid (0.24 M) in 2 mL of

2-methyl-2-butanol previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. The acylation reaction was performed in an agitated parallel system (Carousel 12 Plus Reaction Station™, Radleys) initiated by the addition of CAL-B immobilized on acrylic resin, or functionalized MWCNTs by physi- or chemisorption. The quantity of the used supported enzymes was adjusted to add 1 mg of protein in the reaction medium depending on the immobilization yield. The reaction medium was stirred at 250 rpm at 55 °C. The samples were withdrawn over time, diluted with methanol/water (50/50, v/v) to stop the enzyme activity, and then, stored at 4 °C before HPLC-MS<sup>2</sup> analysis. Each reaction was done in duplicate.

The synthesis of lauroyl-lysine was followed as described by Dettori et al. <sup>24</sup>. A HPLC-MS<sup>2</sup> system was used consisting in a binary delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ ion trap as mass analyzer (Linear Trap Quadrupole) equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in positive electrospray mode (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA). A C18 column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm porosity- Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) equipped with a C18 pre-column (7.5 mm × 2.1 mm, 5 μm porosity- Grace/Alltech Darmstadt, Germany) at 25 °C was used for the chromatographic separation. Mobile phases corresponded to methanol/water/ TFA (80:20:0.1, v/v/v) for the phase A and methanol/TFA (100:0.1, v/v) for the phase B. The elution was carried out using a linear gradient from 0% to 100% of B for 5 min and then an isocratic step at 100% of B for 10 min, at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. These conditions allowed the separation of α-lauroyl lysine and ε-lauroyl lysine with 9.39 min and 10.0 min retention times, respectively. Mass spectrometric conditions consisted in spray voltage at +4.5 kV with capillary temperature at 250 °C and capillary voltage at 48 V; tube lens, split lens and front lens voltages were set at 120 V, -34 V and -4.25 V, respectively. Full scan MS spectra were performed from *m/z* 100 to 1000 and additional MS<sup>2</sup> scans were done in order to verify the enzyme selectivity thanks to structural information based on daughter ions elucidation. Raw data were processed using Xcalibur software (version 2.1 Thermo Scientific).

## 2.2. Techniques used for nanomaterial characterization

The used optical microscope was an Olympus TH4-200 BXS1. The

solution was simply dropped on a microscope slide and covered by a cover glass. Observations were done with an X10 objective.

TEM and HRTEM observations were done by means of a JEOL ARM 200 F cold FEG apparatus (operating voltage of 80 kV). A nitrogen liquid-cooling (-175 °C) sample holder was used to image the enzymes. The TEM grids (holey carbon grid, 200 mesh size) were prepared by depositing a drop of a suspension of the sample dispersed by gentle sonication in ethanol. At least 30 images from the observations of many zones on the grid were analyzed; the shown TEM images are those representative of the general aspect of the observed samples.

TGA was carried out with a Setaram Setsys evolution 1750 Thermal Gravimetric Analyser. Temperature was increased from room temperature to 900 °C at 5 °C/min under dry air or helium (20 mL/min). For mass spectrometry (MS) investigation, a Pfeiffer GSD 301C Vacuum OmniStar mass spectrometer coupled with the TGA apparatus was used.

Raman spectroscopy characterization was performed using a LabRAM HR 800 micro-Raman spectrometer (incident wavelength 632.8 nm, power 0.25 mW/μm<sup>2</sup>). To guarantee reproducibility, at least three spectra were recorded on different areas for the same sample. For Raman frequency calibration, a silicon wafer was used as reference. For data analysis, after subtracting a baseline, the I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub> intensity ratio was calculated from the maximum height of the D and the G band for each spectrum.

Adsorption volumetry was performed using krypton at 77.3 K. Before analysis, the MWCNT samples were outgassed under a vacuum of 4 × 10<sup>-5</sup> Pa at 180 °C for at least 5 days. The isotherms were normalized by the amount of carbon content (from TGA) in the samples. The specific surface area of the samples was determined by using the well-known Brunauer-Emmett-Teller (BET) model.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Maximizing the accessible surface of the MWCNTs for CAL-B immobilization

Controlling MWCNT characteristics is essential in order to optimally benefit of the surface they can offer during the subsequent immobilization of the enzymes. Ideally, an "all-carbon" material is desired to avoid competing and non-controlled reactions and to control the quality and quantity of the substrate. The purification of MWCNTs was performed by a one-pot gas phase treatment. In the raw sample, there was no carbonaceous impurity and the metallic impurities were present under several forms: cobalt and/or iron oxides and/or carbides and alumina. The used purification method has the advantage to remove all these noncarbon residues with the same treatment since chlorine is expected to favorably react with all these metals [20]. The quantitative evaluation of the metal-based impurity content was conducted by TGA (Fig. 2).

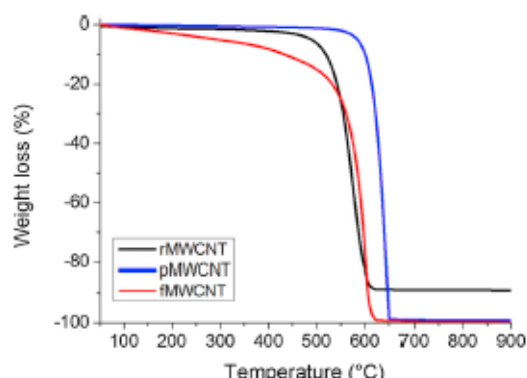


Fig. 2. Thermograms of the raw (black), purified (blue) and functionalized MWCNTs (red).

The difference between the thermogram of the raw (rMWCNT) and that of the purified MWCNTs (pMWCNT) was significant. The main weight loss came from combustion of MWCNTs occurring around 570 °C and 630 °C for rMWCNT and pMWCNT, respectively. Furthermore, the content of metal-based impurities (remaining amount after MWCNT combustion) was about 11.1 wt.% of the initial mass for the raw MWCNTs and reached zero after purification. This attested to the high efficiency of the applied purification treatment for this MWCNT sample. In addition, the observed upshift (+60 °C) of the combustion temperature after removal of the metal-based impurities is usually explained by the elimination of metallic particles. These latter have been shown to catalyze the combustion reaction of MWCNTs, which leads to their lower oxidation resistance [25].

After functionalization, it can be noted that there was no plateau for temperatures below 500 °C and the combustion appeared at lower temperature (about 585 °C). Such lower oxidation resistance may be due to the functional groups or defects that had been introduced to the CNT walls through the functionalization procedure.

Fig. 3 shows TEM images of the MWCNTs at their raw, purified and functionalized state. For all samples, the MWCNTs appeared as nanowires with the well visible inner channels especially at high magnification images (b, c, d). The outer diameter of the tubes was around 10–15 nm and the number of their walls could vary from 3 to 15. Their inner channel size often reached 10 nm. No carbonaceous species other than CNTs were observed in the samples. The metal-based impurities could be observed time to time as dark particles (see insert Fig. 3a). Except for the absence of the metallic impurities, the purified MWCNTs showed no significant changes compared to starting sample (Figs. 3c and 3d). By contrast, after functionalization, the walls of fMWCNT appeared damaged. Raman spectroscopy is widely used to evidence covalent functionalization of CNTs [26]. The D band (around 1350 cm<sup>-1</sup>) is characteristic of C=C double bonds from the sp<sup>2</sup> network. Increase in intensity of the D band with respect to that of the G band (I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub>), is considered as the signature of defect introduction in CNT structure due to grafting of functional groups. In Fig. 4, the Raman intensity was normalized to that of the G band, in that respect, the D band intensity can be visually compared.

I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub> was around 1.8 and 1.6 for rMWCNT and pMWCNT, respectively. The intensity of the D band was slightly decreased after purification meaning that the purification treatment did not damage the MWCNTs. After functionalization, the D band was much more pronounced (I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub> was about 2.2 for fMWCNT) in agreement with an efficient functionalization by the applied chemical method.

As already mentioned, carbon nanotubes are interesting support for enzyme immobilization because they offer high external surface which is potentially rapidly accessible compared to porous materials such silica, other porous oxides or synthetic polymers [1]. In this work, for surface property investigation, it was chosen to use krypton as adsorbate; being a rare gas, krypton adsorption phenomenon on the CNT surface will only be physical. Fig. 5 shows the adsorption isotherms for rMWCNT, pMWCNT and fMWCNT. The isotherms of the raw and purified MWCNTs were quite similar. In agreement with TEM and Raman spectroscopy results, adsorption study revealed that the applied purification treatment left the properties of the nanotube surface unchanged. The isotherms for these two samples showed some steps (type VI form the IUPAC classification). Each step corresponded to the formation of a Kr monolayer and these steps were characteristic of the adsorption on a fraction of uniform, homogeneous surface in agreement with the poorly-defected structure of rMWCNT and pMWCNT [27,28]. The isotherm of the functionalized MWCNTs showed a very different shape with i) disappearance of the steps indicating that the adsorption process occurred on less homogeneous surfaces and ii) larger gas quantities adsorbed, which was probably due to the damaging of the MWCNT walls by functionalization.

Using the well-known Brunauer-Emmett-Teller (BET) model, the specific surface areas extracted from the adsorbed amounts plotted in

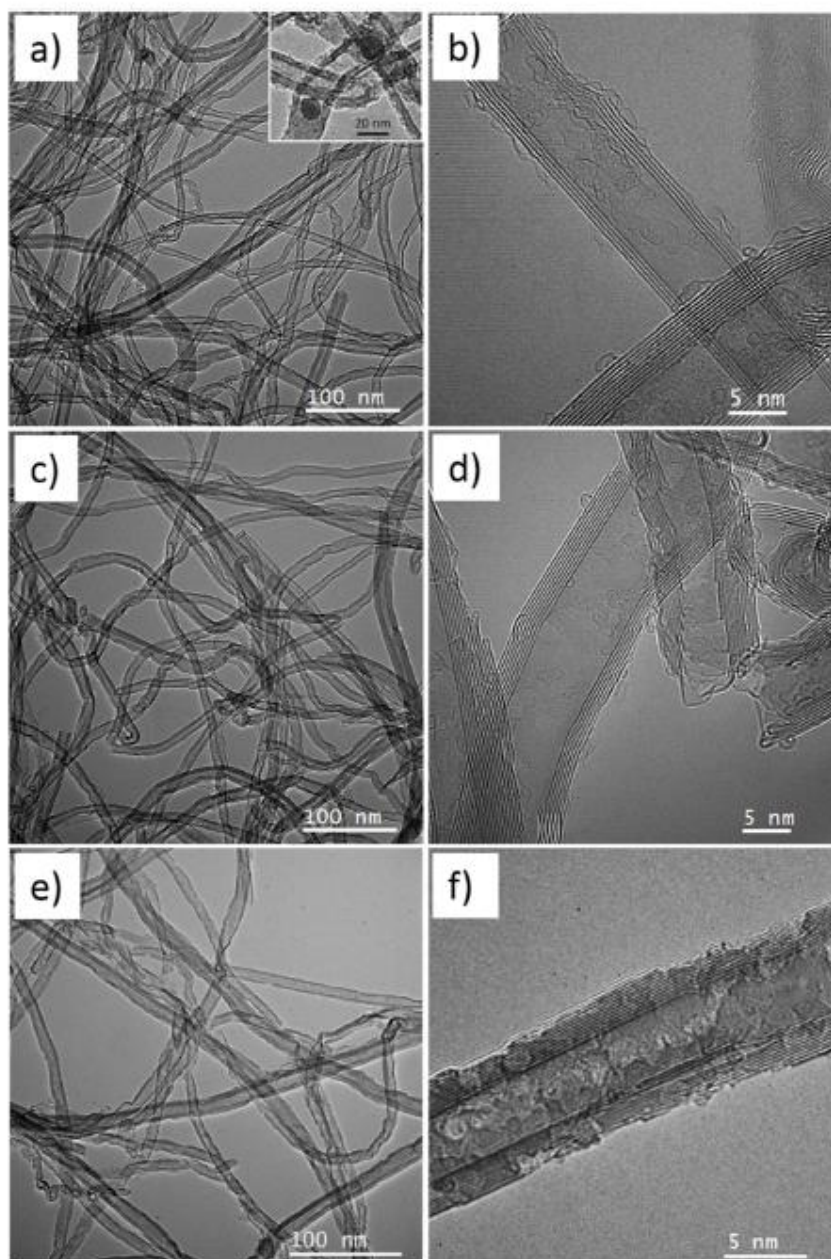


Fig. 3. Typical bright field TEM images of (a and b) the raw (rMWCNT), (c and d) the purified (pMWCNT) and (e and f) the functionalized MWCNTs (fMWCNT) with low magnification (a, c, e) and high magnification (b, d, f).

Fig. 5 were quite similar for the raw and purified samples ( $201 \text{ m}^2/\text{g}$  for rMWCNT and  $207 \text{ m}^2/\text{g}$  for pMWCNT). This was consistent with the preservation of the nanotube surface properties during the purification treatment. Regarding the functionalized sample, the BET model gave a specific surface area about 40% greater ( $287 \text{ m}^2/\text{g}$  for fMWCNT). The observed increase in surface after functionalization is in agreement with previous works. [29,30] Functionalization is indeed able to open tube ends and generate defects on the sidewall of nanotubes, which gives access into the cavity of MWCNTs and increases that way their surface area [29–31].

The prepared functionalized MWCNTs showed interesting properties for their further use to immobilize CAL-B since their functionalization resulted in an increase of the accessible surface and the evidenced efficiency of the functionalization treatment was expected to increase their affinity with the used water medium for immobilization.

### 3.2. Immobilization of CAL-B on the chemically modified MWCNTs

#### 3.2.1. Optimization of the functionalized dispersion quality

CAL-B was immobilized in water at pH 10 (by NaOH addition)

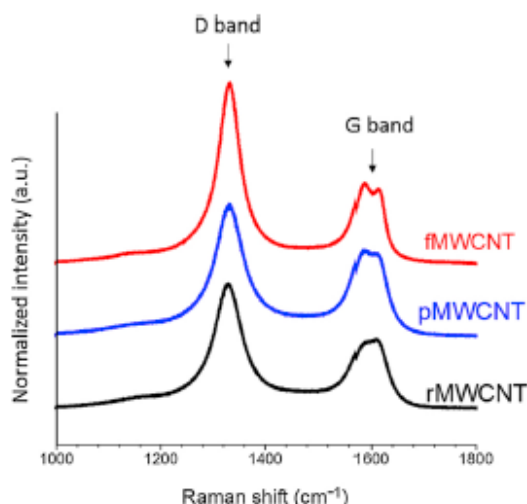


Fig. 4. Raman spectra of the raw (rMWCNT), the purified (pMWCNT) and the functionalized MWCNTs (fMWCNT).

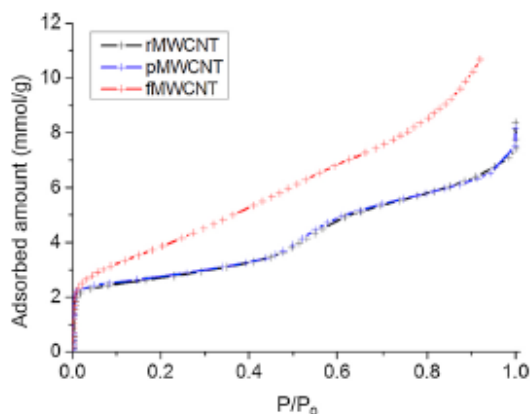


Fig. 5. Krypton adsorption isotherms on rMWCNT, pMWCNT and fMWCNT at 77.3 K.  $P/P_0$ : normalized krypton equilibrium pressure relative to its saturation vapor pressure, 227 Pa.

instead of in a Tris buffer solution because of the strong and rapid aggregation of fMWCNT observed in the buffer solution while the functionalized MWCNTs showed a quite good dispersion quality in alkaline water (Fig. 6). At pH 10, the carboxylic groups expected to be grafted to the MWCNT surface (see Supporting Information, Fig. S1) were expected to be deprotonated leading to electrostatic repulsive forces probably responsible for the good dispersion quality in alkaline water. The re-aggregation within the buffer solution might be due to an ionic effect screening due to the high ionic strength in this medium.

### 3.2.2. Immobilization kinetic

The kinetic for the non-covalent immobilization of Cal-B was studied in alkaline water by TGA (Fig. 7) and by UV-vis (see Supporting Information, Fig. S2). Although based on a really different principle, the results obtained by these two techniques were in good agreement. For the following study, TGA was preferably investigated. The maximum immobilization level was reached after 1–2 h around 15 wt.%. For the preparation of ncCAL-B@fMWCNT catalyst, the immobilization time was fixed at 2 h.

### 3.2.3. Non-covalent immobilization and covalent immobilization

The weight loss of the prepared non-covalent CAL-B@fMWCNT

from TGA is shown in Fig. 8a. An additional loss (+ 16%, cf. Table 1), compared to that of fMWCNT was observed on the TGA curve of ncCAL-B@fMWCNT. By MS, phenyl group features can be used as the signature of the presence of enzymes in the material. The MS features showed that typically  $m/z51$  was only visible after immobilization (Fig. 8b). For sake of clarity, only this fragment was shown but the others belonging to phenyl groups (see Supporting Information, Fig. S3) were also well active after immobilization and not before.

Fig. 9 shows TEM images of CAL-B covalently immobilized on the MWCNTs. At low magnification (Fig. 9a), as expected, the aspect of the MWCNTs was similar to that of the functionalized MWCNTs. At higher magnification (Fig. 9b–d), an amorphous deposit assigned to the enzymes could be observed on the external surface of the MWCNT walls. These latter appeared differently than those of the functionalized MWCNTs (Fig. 3f) in agreement with the presence of numerous CAL-B enzymes (26 wt.%, Table 1) surrounding the MWCNTs modifying the wall appearance in the images.

A completely selective covalent immobilization is never easy to achieve since the enzymes surrounding the substrate cannot be forbidden to physically adsorb as well. It is certainly the case for fMWCNT which showed a good ability for non-covalent CAL-B immobilization (16 wt.%, Table 1). This is the reason why enzyme quantification for cCAL-B@MWCNT was performed just after the covalent immobilization process and after several reaction cycles (after activity stabilization, cf. the following section) after leaching of the non-covalently adsorbed CAL-B (Fig. 8). This approach allowed to selectively determine the covalent immobilization level (Table 1).

From the mass loss recorded for fMWCNT and by hypothesizing that the grafting groups were mainly carboxylic acids [21], the functionalization level could be estimated from the following relation (1) [32]:

$$n = \frac{M_{\text{COOH}}}{M_{\text{C}}} \left( \frac{100}{\text{WL}} - 1 \right) \quad (1)$$

Where  $M_{\text{COOH}}$  and  $M_{\text{C}}$  are the molar weights of a carboxylic acid group and a carbon atom, respectively; and WL, the weight assigned to the functional group loss from TGA, i.e. 17% (Fig. 8a and Table 1).  $n$  determined from (1) was about 18. That means that the used functionalized MWCNTs for CAL-B immobilization bear 1 functional groups every 18 carbon atoms or one functional group was grafted every 3  $\text{C}_6$ -rings, in average. Furthermore, it is known that the applied oxidative attack leads to preferential grafting at the defects and at the extremities of the MWCNTs which are much more reactive sites than the  $\text{sp}^2$  carbon atoms of the MWCNT skeleton [33,34]. This is the reason why the functional groups were certainly not homogeneously disseminated on the MWCNT surface leaving rather large areas untouched, these latter remaining that way more hydrophobic while the functionalized areas (hydrophilic) were responsible for the facile dispersion of the MWCNTs in water. Physical adsorption of CAL-B enzymes possessing as well hydrophobic parts reached 16% in weight of protein loading which was comparable of other works [4,23]. The used amino-acid coupling for covalent immobilization significantly increased the protein loading even after elimination of the non-covalently adsorbed (5%) since it remained as high as 21% after cycling.

### 3.3. Geranyl acetate synthesis in $\text{scCO}_2$

Geranyl acetate synthesis was performed with both ncCAL-B@MWCNT and cCAL-B@MWCNT under  $\text{scCO}_2$  by using the set-up shown in Fig. 1. For all experiments, the residence time in the PBR was as short as about 6 s. The conversion rate of geraniol to geranyl acetate by the prepared biocatalysts over cycling is shown in Fig. 10. At cycle 1, significant conversions of 9.9% and 6.9% could be observed for ncCAL-B@MWCNT and cCAL-B@MWCNT, respectively. From cycle 1 to cycle 5, however, a significant decay in conversion was observed in both cases. This decay when using ncCAL-B@MWCNT could be due to very fast depressurization steps (200 to 1 bar in about 8 s) between each cycle

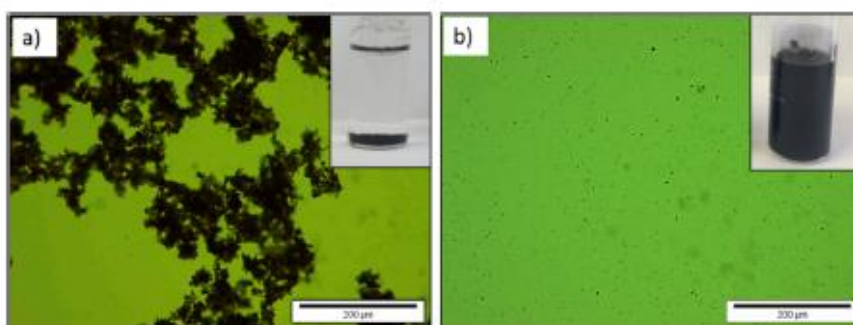


Fig. 6. Optical microscope images of fMWCNT in Tris buffer solution (a) and in alkaline water (b). The visual aspect of each corresponding solution is visible in the insert at the top right corner of the corresponding image.

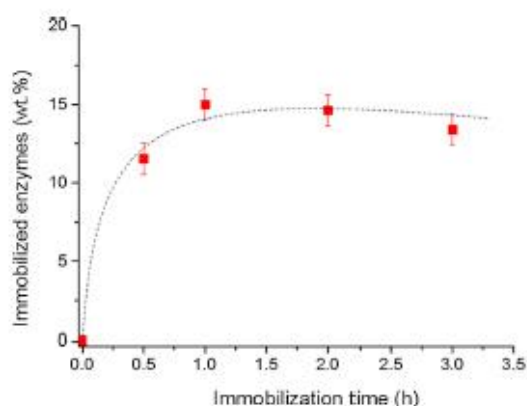


Fig. 7. Immobilization kinetic for non-covalent adsorption of CAL-B on fMWCNT from TGA analysis.

that might lead to CAL-B leaching from the MWCNT surface. Besides, MWCNTs have a high mechanical and thermal resistance but low internal porosity compared to polymetacrylate-based polymers for example, which could also favor CAL-B leaching.

Catalytic performances of the prepared biocatalysts (ncCAL-B@MWCNT and cCAL-B@MWCNT) were compared with those of a commercial lipase immobilized on polymeric meso-macroporous beads (Lipozyme 435) achieved under  $\text{scCO}_2$  in the reactor using the same operating conditions [18]. In that former study, the reactor was filled with 300 mg of Lipozyme 435 beads (corresponding to 1 mL bulk volume) and 36% conversion had been achieved without any change over 6 consecutive running cycles.

When focusing on the conversion rate achieved with cCAL-B@MWCNT, it could be observed that despite a decay in conversion, a

plateau in conversion was reached starting from cycle 4. Moreover, at cycle 5, conversion clearly turned in favor of cCAL-B@MWCNT (2% against only 1% with ncCAL-B@MWCNT), thus showing the interest of using covalent binding with the prepared MWCNTs. Even if the activity observed for the present MWCNT-based catalysts remained to be improved by further investigations. Interestingly, it was demonstrated here that MWCNTs can be used as carriers for lipase and used for terpene ester production in  $\text{scCO}_2$ , which has never been demonstrated before.

To go further in the analysis of the conversion results for our MWCNT-based biocatalysts, the Turn Over Frequency (TOF) of CAL-B was determined, expressed in mole of geranyl acetate per mole of CAL-B per min for CAL-B immobilized non covalently or covalently on MWCNTs, before and after cycling (4 additional consecutive runs of 30 min each) (Table 2).

Before cycling ncCAL-B@MWCNT and cCAL-B@MWCNT showed a TOF of 2.7 and 11.5 mol of geranyl acetate  $\text{M}^{-1}$  of CAL-B  $\text{min}^{-1}$ , respectively. After cycling, cCAL-B@MWCNT, showed a stabilized residual TOF of 4.1 mol of geranyl acetate  $\text{M}^{-1}$  of CAL-B  $\text{min}^{-1}$ , while twice lower and non-stabilized TOF was achieved with non-covalent binding. When comparing these data with data obtained previously by Bourkaib et al. [18] in similar operating conditions but using 300 mg of Lipozyme 435 beads (10.08% w/w of CAL-B according to dos Santos et al. [35]), it was observed a significantly higher TOF of 62.7 mol of geranyl acetate  $\text{M}^{-1}$  of CAL-B  $\text{min}^{-1}$ , expected for this commercial meso-macroporous catalyst. Furthermore, development of new biocatalysts using CNTs as support on which CAL-B was covalently or non-covalently immobilized has emerged over the past few years.

In addition, and despite the lower TOF achieved in this study with MWCNTs as carriers versus what was achieved by other authors such as Bourkaib et al. with commercial polymeric macroporous beads [18], it is of great importance to underline the specificity of the present process as compared to the ones observed from literature and also using MWCNTs as carriers. Indeed, when using continuous processing with a

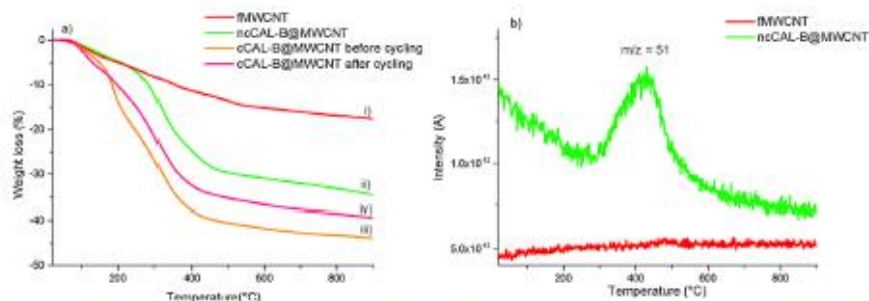


Fig. 8. TGA-MS results; (a) TGA of fMWCNT (I), ncCAL-B@fMWCNT (II), cCAL-B@MWCNT before cycling (III) and cCAL-B@MWCNT after cycling (IV) and (b)  $m/z=51$  of fMWCNT and ncCAL-B@MWCNT.

**Table 1**

Loading of CAL-B immobilized on the functionalized MWCNTs determined for CAL-B non-covalently immobilized on the functionalized MWCNTs (ncCAL-B@MWCNT) and CAL-B covalently immobilized of the functionalized MWCNTs (cCAL-B@MWCNT) before and after cycling.

Sample/Catalyst	MWCNT	ncCAL-B@ MWCNT	cCAL-B@ MWCNT before cycling	cCAL-B@ MWCNT after cycling
Weight loss by TGA (%)	17	33	38	43
CAL-B loading (wt.%)	–	16	26	21

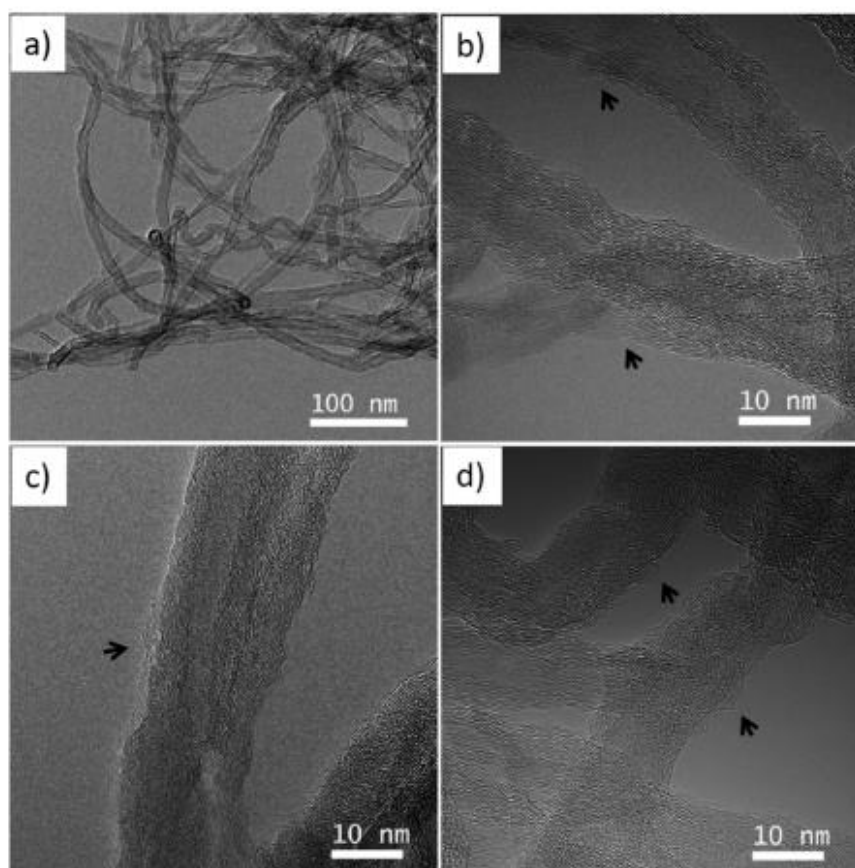


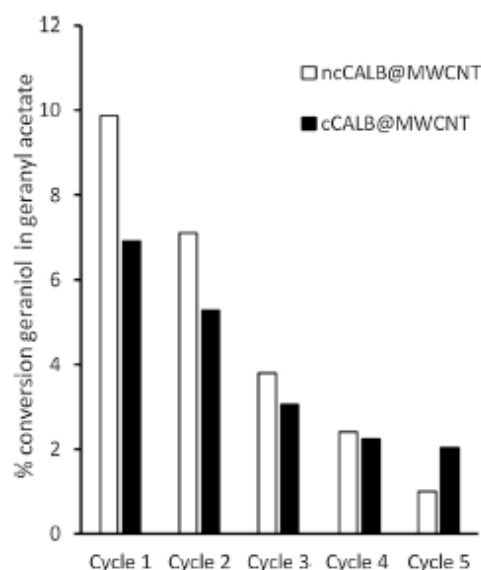
Fig. 9. Typical bright field TEM images of cCAL-B@MWCNT (before cycling) at (a) low magnification and (b, c, d) high magnification. Arrows help to localize the enzymes on the MWCNT surface.

packed bed reactor, it was actually not required to perform cycling because reaction products and substrates and CO<sub>2</sub> are continuously removed from the reactor at the level of the back-pressure regulator-separator. Five consecutive 30 min catalytic cycles were performed with a depressurization step between each of them in order to proceed like in most studies where batch reactors are used (see Table S1). At cycle 5, only 10.1% of unstabilized activity was retained in non-covalent immobilization (TOF of 2.05 min<sup>-1</sup>) and 28.5% in covalent immobilization (TOF of 4.1 min<sup>-1</sup>). But if the reaction had been prolonged during several hours, the conversion would probably stay very close from the ones of cycle 1 (i.e. 9.9% and 6.9% in non-covalent and covalent immobilization, respectively). Corresponding TOF would probably have then be equal or very close to 11.5 min<sup>-1</sup> when focusing on covalent immobilization (Table 2). When comparing these results with the ones achieved recently by Szelwicka et al., who used CAL-B non-covalently immobilized on MWCNTs to esterify succinic acid with n-butanol in cyclohexane and in a batch reactor<sup>14</sup>, it can be observed that a TOF of 10.9 min<sup>-1</sup> was reached. Although substrates used for the esterification reaction are different, this result shows that the catalytic

performance in esterification of immobilized CAL-B in continuous reactor and with scCO<sub>2</sub> as a solvent was actually quite similar, the main difference being that CO<sub>2</sub> was used as a green solvent in a continuous process removing water continuously from the reactor.

Furthermore, it should be stressed, that according to Chrastil equation [36] the solubility of water in a supercritical CO<sub>2</sub> at 200 bar and 55 °C is 2.32 mg/mL (see also Supporting Information) and that, even considering a full conversion of 57 mM substrates concentrations, it would generate only 1.026 mg of water per mL of supercritical CO<sub>2</sub> thus avoiding liquid water in the reactor and associated reverse hydrolysis reaction. This water solubilized in the CO<sub>2</sub> is continuously removed from the reactor all along each run, at the level of the back-pressure separator. This is precisely why, with the same reactor, Bourkaib et al. could reach 36% conversion in similar conditions but using the commercial Lipozyme 435. [18]

The TOF was however significantly higher (about 4 times) by using covalent binding as compared to non-covalent binding (Table 2). It can be supposed that the active site of CAL-B might be less accessible to substrates due to an unfavorable positioning for physical adsorption of



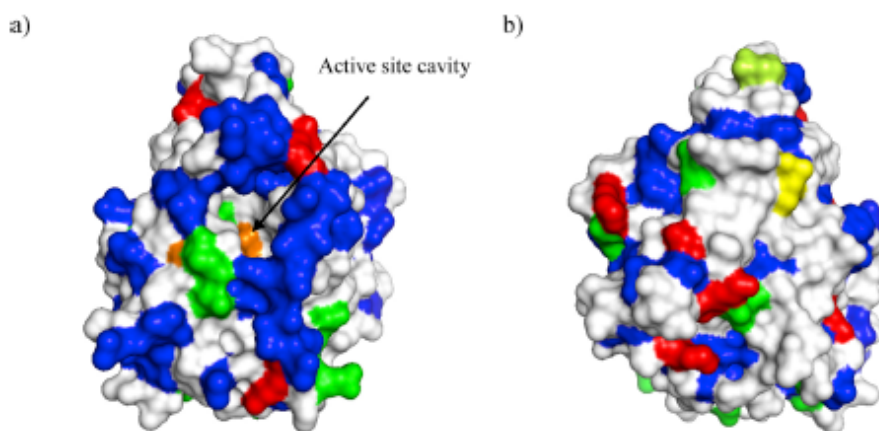
**Fig. 10.** Conversion rate (%) of geraniol and acetate in geranyl acetate in  $scCO_2$  using ncCAL-B@MWCNT (white bars) or cCAL-B@MWCNT (black bars). Experimental conditions:  $scCO_2$  at 55 °C and 200 bars,  $scCO_2$  flow rate of 3.94 mL/min (3 mL/min in liquid form), substrates concentrations of 43.4 mM in  $scCO_2$ , approx. residence time in the fully charged 1 mL PBR was only 6 s, 132 mg of ncCAL-B@MWCNT or cCAL-B@MWCNT in the reactor, 300 mg of Lipzyme 435 beads, 30 min per run.

**Table 2**

TOF of CAL-B immobilized by covalent or physical adsorption on the functionalized MWCNT, before or after cycling (for covalent immobilization).

1 cm <sup>3</sup> bulk volume in the reactor	TOF (M geranyl acetate·M <sup>-1</sup> Cal-B·min <sup>-1</sup> )
ncCAL-B@MWCNT before cycling	2.7
cCAL-B@MWCNT before cycling	11.5
cCAL-B@MWCNT after cycling	4.1

CAL-B on the quite hydrophobic treated MWCNTs used here. Fig. 11 shows a mapping of the surface of CAL-B with its hydrophobic and hydrophilic zones. It was designed from 1TCA PDB code and using PyMOL Molecular Graphics System (Schrodinger LLC, Portland, OR, USA). When using a simple adsorption on the used MWCNTs having hydrophobic domains, the active site of the CAL-B close to its hydrophobic zones will spontaneously position toward the surface of the MWCNTs thus potentially limiting accessibility of substrates to its



**Fig. 11.** CAL-B surface with its hydrophobic and hydrophilic zones. Hydrophobic residues gly, ala, val, leu, ileu, tyr, cys, met, phe are represented in blue; hydrophilic residues asp and glu are represented in green; hydrophilic residue Lys (used for covalent binding) are represented in red; catalytic triad of the active site (Ser 105, Asp 187, His 224) is in orange; N and C terminal residues are shown in yellow and lemon yellow, respectively. a) active site and mainly hydrophobic side, b) opposite and mainly hydrophilic side (180° rotation). These two figures were designed using PyMOL Molecular Graphics System and 1TCA PDB code for CAL-B.

catalytic triad. This scenario is consistent with the good affinity of proteins and lipases for hydrophobic carrier material reported in literature [37–40]. Conversely, when using covalent binding with  $NH_2$  groups from lysine residues, it is very likely that the active site is more accessible to the substrates because, among the 9 lysine residues of CAL-B, none is very close from the active site entrance and 6 of them are clearly on the opposite side of the active site.

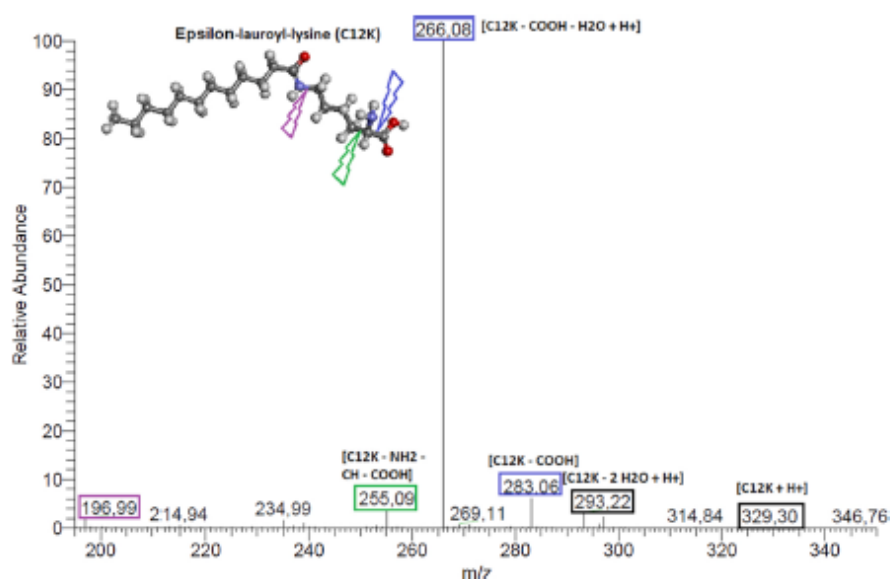
### 3.4. Selectivity of supported enzymes on carbon nanotubes

As the activity appeared to be affected by the immobilization method, it was also checked whether it led to a modification of regioselectivity. Several studies reported that enzyme immobilization can lead to modification of the reaction selectivity depending on the morphologies (average pore diameter, surface area, etc.) and nature of the supports [41]. For instance, the regioselectivity of lipases can be modified by its immobilization on hydrophobic supports: *Thermomyces lanuginosus* lipase adsorbed on C18 supports lost its 1,3 regioselectivity towards the hydrolysis of oils [42]. In the present study, the synthesis of lauroyl lysine catalyzed by the two prepared MWCNT-based catalysts was investigated and compared with Novozym 435 as a reference. Acylation of lysine can lead to the synthesis of 3 different products including two monoacylated products in  $\alpha$  or  $\epsilon$  position and a diacylated product. A previous work showed that the synthesis of mono lauroyl-lysine mainly occurred by Novozym 435 catalysis with a regioselectivity towards the amine function in  $\epsilon$  position and no diacylated molecule was synthesized [24].

The qualitative analyses of reaction medium for both supported enzymes systems on MWCNTs by TLC demonstrated the presence of spots corresponding to monoacylated lysine with a retention factor of 0.58 similar to that obtained for reaction with Novozym 435 (data not shown). The analysis of the synthesized products by HPLC-MS<sup>2</sup> confirmed the production of the monoacylated lauroyl-lysine with a mass peak of  $[M+H]^+$  of 329. Furthermore, the fragmentation of this mass peak (Fig. 12) led to one major daughter ion  $[M+H]^+$  of 266 corresponding to  $[(\text{lauroyl-K}) - H_2O - COOH + H]^+$ , and some minor daughter ions  $[M+H]^+$  of 197; 283 and 293 corresponding to the specific mass spectrum profile of lysine acylated by lauric acid in  $\epsilon$  position. Consequently, similar regioselectivity has been demonstrated for CAL-B of immobilized on MWCNTs and with Novozym 435.

## 4. Conclusion

Synthesis of geranyl acetate by CAL-B immobilized on functionalized MWCNTs was investigated in supercritical  $CO_2$  for the first time. Post-synthesis functionalization of purified MWCNTs by a relatively soft oxidant method has allowed to counterbalance the attractive van der



**Fig. 12.** MS<sup>2</sup> spectrum of the peak corresponding to the monoacylated product ( $[M+H]^+$  = 329) obtained by acylation of lysine with lauric acid catalyzed by CAL-B adsorbed on MWCNTs. Similar MS<sup>2</sup> spectrum was obtained for CAL-B immobilized by covalent bonds to MWCNT surface.

Waals forces at the origin of the commonly observed CNT aggregation in water. The chemically modified MWCNTs also bear remaining hydrophobic zones which were evidenced as favorable adsorption sites in the case of the non-covalent route. The accessible surface could be advantageously improved leading to good CAL-B loadings for both non-covalent and covalent immobilization. The determined enzymatic activity for this fully green continuous process was in the same order of magnitude than that reported for CAL-B@CNT catalysts used in conventional batch conditions in organic solvent. CAL-B regioselectivity of conversion was shown to be unchanged by using the prepared functionalized MWCNTs as support. Improvement of the conversion rate for new catalysts derived from the present work is in progress. The important finding of this work is that MWCNTs are promising support materials for enzymatic synthesis in supercritical CO<sub>2</sub>, which could open a new field of investigations in biocatalysis.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Mr. X. Fulleringer for his help for sample preparation. The authors thank Mr. L. Aranda and Mr. P. Franchetti for their valuable help for TGA and Raman spectroscopy, respectively. The authors acknowledge support of LRGP and LJI by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d'avenir – ANR). The authors acknowledge support for LRGP and LJI from "PEPS Mirabelle" grant (project BioNanoSurf) from Université de Lorraine and CNRS.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.08.046>.

#### References

- [1] J. Zdzarta, A.S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility, *Catalysts* 8 (2) (2018) 92, <https://doi.org/10.3390/catal8020092>.
- [2] W. Shuai, R.K. Das, M. Naghdi, S.K. Brar, M. Verma, A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64 (4) (2017) 496–508, <https://doi.org/10.1002/bab.1515>.
- [3] W. Feng, P. Ji, Enzymes immobilized on carbon nanotubes, *Biotechnol. Adv.* 29 (6)

- (2011) 889–895, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.007>.
- [4] I.V. Pavlidis, T. Tsoufis, A. Enotiadis, D. Gourmis, H. Stamatis, Functionalized multi-wall carbon nanotubes for lipase immobilization, *Adv. Eng. Mater.* 12 (5) (2010) B179–B183, <https://doi.org/10.1002/adem.200980021>.
- [5] N.Z. Prlainovic, D.I. Bezbradica, Z.D. Knezevic-Jugovic, S.I. Stevanovic, M.I.A. Ivic, P.S. Uskokovic, D.Z. Mijin, Adsorption of lipase from *Candida Rugosa* on multi walled carbon nanotubes, *J. Ind. Eng. Chem.* 19 (1) (2013) 279–285, <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.08.012>.
- [6] L.C. Bencze, J.H. Bartha-Vari, G. Katona, M.I. Tosa, C. Paizs, F.-D. Irimie, Nanobiocatalysis of *Candida antarctica* lipase B and single-walled carbon nanotubes in biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 200 (2016) 853–860, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.072>.
- [7] C. Ke, X. Li, S. Huang, L. Xu, Y. Yan, Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on modified multi-walled carbon nanotubes, *RSC Adv.* 4 (101) (2014) 57810–57818, <https://doi.org/10.1039/c4ra10517f>.
- [8] J.H. Bartha-Vari, M.I. Tosa, F.-D. Irimie, D. Weiser, Z. Boros, B.G. Vertessy, C. Paizs, L. Poppe, Immobilization of phenylalanine ammonia-lyase on single-walled carbon nanotubes for stereoselective biotransformations in batch and continuous-flow modes, *ChemCatChem* 7 (7) (2015) 1122–1128, <https://doi.org/10.1002/cctc.201402894>.
- [9] A. Zaks, A. Klivanov, Enzyme-catalyzed processes in organic-solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (10) (1985) 3192–3196, <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3192>.
- [10] E. Husson, C. Humeau, F. Blanchard, X. Framboisier, I. Marc, I. Chevalot, Chemo-selectivity of the N,O-Enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 55 (3–4) (2008) 110–117, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.02.004>.
- [11] P. Tufvesson, A. Annerling, R. Hatti-Kaul, D. Adlercreutz, Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides, *Biotechnol. Bioeng.* 97 (3) (2007) 447–453, <https://doi.org/10.1002/bit.21258>.
- [12] E. Husson, C. Humeau, C. Paris, R. Vanderesse, X. Framboisier, I. Marc, I. Chevalot, Enzymatic acylation of polar dipeptides: influence of reaction media and molecular environment of functional groups, *Process. Biochem.* 44 (4) (2009) 428–434, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.030>.
- [13] R.M. Lau, F. van Rantwijk, K.R. Seddon, R.A. Sheldon, Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Org. Lett.* 2 (26) (2000) 4189–4191, <https://doi.org/10.1021/ol006732d>.
- [14] A. Szelwicka, S. Boncel, S. Jurczyk, A. Chrobok, Exceptionally active and reusable nanobiocatalyst comprising lipase non-covalently immobilized on multi-wall carbon nanotubes for the synthesis of diester plasticizers, *Appl. Catal. A Gen.* 574 (2019) 41–47, <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2019.01.030>.
- [15] T. Raghavendra, A. Basak, I.M. Manocha, A.R. Shah, D. Madamwar, Robust nanobiocatalysts of *Candida antarctica* lipase B - multiwalled carbon nanotubes: characterization and application for multiple usages in non-aqueous biocatalysis, *Bioresour. Technol.* 140 (2013) 103–110, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.071>.
- [16] E.C. Celia, E. Cernia, I. D'Acquarica, C. Palocci, S. Soro, High yield and optical purity in biocatalysed acylation of Trans-2-Phenyl-1-Cyclohexanol with *Candida Rugosa* lipase in non-conventional media, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 6 (5) (1999) 495–503, [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00014-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00014-4).
- [17] C. Palocci, M. Falconi, L. Chronopoulou, E. Cernia, Lipase-catalyzed regioselective acylation of tritylglycosides in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 45



- (1) (2008) 88–93, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.11.009>.
- [18] M.C. Bourkaib, H. Randriamalala, L. Dettori, C. Humeau, S. Delaunay, I. Chevalot, Y. Guivarc'h, Enzymatic synthesis of geranyl acetate in packed bed reactor in supercritical carbon dioxide under various pressure-temperature conditions and reactor configurations, *Process Biochem.* 71 (2018) 118–126, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.008>.
- [19] S. Kamat, E. Beckman, A. Russell, Control of enzyme-activity by solvent engineering in supercritical fluids, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 205 (1993) 75-B107.
- [20] G. Mercier, C. Herold, J.-F. Mareche, S. Cahen, J. Gleize, J. Ghanbaja, G. Lamura, C. Bellouard, B. Vigolo, Selective removal of metal impurities from single walled carbon nanotube samples, *New J. Chem.* 37 (3) (2013) 790–795, <https://doi.org/10.1039/c2nj41057e>.
- [21] J. Zhang, H.L. Zou, Q. Qing, Y.L. Yang, Q.W. Li, Z.F. Liu, X.Y. Guo, Z.L. Du, Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. B* 107 (16) (2003) 3712–3718, <https://doi.org/10.1021/jp027500a>.
- [22] E. Voss, B. Vigolo, G. Medjahdi, C. Herold, J.-F. Mareche, J. Ghanbaja, F. Le Normand, V. Mamane, Covalent functionalization of polyhedral graphitic particles synthesized by arc discharge from graphite, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (7) (2017) 5405–5410, <https://doi.org/10.1039/c6cp08568g>.
- [23] M. Markiton, S. Boncel, D. Janas, A. Chrobok, Highly active nanobiocatalyst from lipase noncovalently immobilized on multiwalled carbon nanotubes for Baeyer–Villiger synthesis of Lactones, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2) (2017) 1685–1691, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02433>.
- [24] L. Dettori, C. Jelsch, Y. Guivarc'h, S. Delaunay, X. Framboisier, I. Chevalot, C. Humeau, Molecular rules for selectivity in lipase-catalysed acylation of lysine, *Process Biochem.* 74 (2018) 50–60, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.021>.
- [25] I.W. Chiang, R.E. Brinson, R.E. Smalley, J.L. Margrave, R.H. Hauge, Purification and characterization of single-wall carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. B* 105 (6) (2001) 1157–1161, <https://doi.org/10.1021/jp003453z>.
- [26] C.A. Dyke, J.M. Tour, Solvent-free functionalization of carbon nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (5) (2003) 1156–1157, <https://doi.org/10.1021/ja0289806>.
- [27] A. Thomy, X. Duval, J. Regnier, Two-dimensional phase transitions as displayed by adsorption isotherms, *Surf. Sci. Rep.* 1 (1) (1981) 1–38, [https://doi.org/10.1016/0167-5729\(81\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0167-5729(81)90004-2).
- [28] M.R. Babaa, E. McRae, S. Delpeux, J. Ghanbaja, F. Valsaque, F. Beguin, Surface characterisation of template-synthesised multi-walled carbon nanotubes, *Chem. Phys. Lett.* 396 (1–3) (2004) 49–53, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.07.070>.
- [29] C.-C. Hu, J.-H. Su, T.-C. Wen, Modification of multi-walled carbon nanotubes for electric double-layer capacitors: tube opening and surface functionalization, *J. Phys. Chem. Solids* 68 (12) (2007) 2353–2362, <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2007.07.002>.
- [30] M.V. Naseh, A.A. Khodadadi, Y. Mortazavi, O.A. Sahrsei, F. Pourfayaz, S.M. Sedghi, Functionalization of Carbon Nanotubes Using Nitric Acid Oxidation and DBD Plasma, (2009), p. 3.
- [31] M.E. Birch, T.A. Ruda-Eberenz, M. Chai, R. Andrews, R.L. Hatfield, Properties that influence the specific surface areas of carbon nanotubes and nanofibers, *Ann. Occup. Hyg.* 57 (9) (2013) 1148–1166, <https://doi.org/10.1093/annhyg/met042>.
- [32] V. Mamane, G. Mercier, J.A. Shukor, J. Gleize, A. Azizan, Y. Fort, B. Vigolo, Chemis- vs physisorption in the radical functionalization of single-walled carbon nanotubes under microwaves, *Beilstein J. Nanotechnol.* 5 (2014) 537–545, <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.63>.
- [33] X. Devaux, B. Vigolo, E. McRae, F. Valsaque, N. Allali, V. Mamane, Y. Fort, A.V. Soldatov, M. Dossot, S.Y. Tsareva, Covalent functionalization of HiPco single-walled carbon nanotubes: differences in the oxidizing action of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and HNO<sub>3</sub> during a Soft oxidation process, *ChemPhysChem* 16 (12) (2015) 2692–2701, <https://doi.org/10.1002/cphc.201500248>.
- [34] A. Hirsch, Functionalization of single-walled carbon nanotubes, *Angew. Chem. Int. Edit.* 41 (11) (2002) 1853–1859, [https://doi.org/10.1002/1522-3773\(20020603\)41:11<1853::AID-ANIE1853>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1522-3773(20020603)41:11<1853::AID-ANIE1853>3.0.CO;2-N).
- [35] P. dos Santos, G.L. Zabet, M.A.A. Meireles, M.A. Mazutti, J. Martinez, Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide, *Biochem. Eng. J.* 114 (2016) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.018>.
- [36] J. Chrastil, Solubility of solids and liquids in supercritical gases, *J. Phys. Chem.* 86 (5) (1982) 3016–3021, <https://doi.org/10.1021/j100212a041>.
- [37] A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armissen, R. Fernandez-Lafuente, J. Huguat, J.M. Guisan, Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports, *Biotechnol. Bioeng.* 58 (5) (1998) 486–493, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980605\)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980605)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9).
- [38] C. Reichardt, S. Utgenannt, K.-P. Stahmann, O. Klepel, S. Barig, Highly stable adsorptive and covalent immobilization of thermomyces lanuginosus lipase on tailor-made porous carbon material, *Biochem. Eng. J.* 138 (2018) 63–73, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.003>.
- [39] B. Menaa, M. Herrero, V. Rives, M. Lavrenko, D.K. Eggers, Favourable influence of hydrophobic surfaces on protein structure in porous organically-modified silica glasses, *Biomaterials* 29 (18) (2008) 2710–2718, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.02.026>.
- [40] S. Barig, A. Funke, A. Merseburg, K. Schnitzlein, K.-P. Stahmann, Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins hardened on different solid supports, *Enzyme Microb. Technol.* 60 (2014) 47–55, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.03.013>.
- [41] F.J. Plou, M.A. Cruces, M. Ferrer, G. Fuentes, E. Pastor, M. Bernabe, M. Christensen, F. Comelles, J.L. Parra, A. Ballesteros, Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent, *J. Biotechnol.* 96 (1) (2002) 55–66, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00037-8).
- [42] E.A. Silveira, S. Moreno-Perez, A. Basso, S. Serban, R. Pestana-Marmede, P.W. Tardioli, C.S. Farinas, N. Gastejon, G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martin, et al., Biocatalyst engineering of thermomyces lanuginosus lipase adsorbed on hydrophobic supports: modulation of enzyme properties for ethanolysis of oil in solvent-free systems, *J. Biotechnol.* 289 (2019) 126–134, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.11.014>.

## **Procédé enzymatique intensifié et durable de N-acylation d'acides aminés en milieux écocompatibles : caractérisation, cinétiques et immobilisation de nouveaux biocatalyseurs**

**Mots clés :** Acylation, Lipase, Acylase, immobilisation, modélisation, intensification

### **Résumé de la thèse :**

Les acides aminés acylés constituent un important groupe de tensioactifs biosourcés présentant des propriétés techno-fonctionnelles et bioactives très attractifs pour des applications en industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques... La production de ces molécules à l'échelle industrielle se fait par voie chimique suivant la réaction de Schotten-Baumann, qui en dépit de son efficacité, a un effet négatif sur l'environnement et ne présente aucune spécificité de réaction. L'utilisation de biocatalyseurs enzymatiques est l'alternative la plus prometteuse à cette voie chimique. L'objectif de cette thèse était d'évaluer le potentiel catalytique de différentes enzymes pour la réaction de N-acylation des acides aminés en solvants verts. Dans un premier temps, le couple enzyme / substrat le plus adapté à la réaction a été identifié. Les aminoacylases de *Streptomyces ambofaciens* en milieu aqueux ont montré une bonne spécificité de substrat vis-à-vis de nombreux acides aminés contrairement à la lipase B de *Candida antarctica* en milieu non-aqueux. Une relation entre la régiosélectivité des aminoacylases et la longueur de la chaîne du donneur d'acyle a été mise en évidence. Cela a été lié à la présence de l' $\epsilon$ -lysine acylase dans le mélange enzymatique. L'ajout d'ions cobalt a permis une accélération importante de la vitesse initiale de la réaction de N-acylation et une augmentation du taux de conversion. Dans une deuxième phase, les enzymes ont été immobilisées sur différents supports afin de faciliter leur recyclage. Les enzymes immobilisées sur les supports mésoporeux (SBA15) fonctionnalisés avec de l'APTES ont été sélectionnés comme les meilleurs supports pour l'immobilisation des aminoacylases de *S. ambofaciens* permettant de maintenir une certaine activité de l'enzyme après immobilisation. Les performances de CALB après immobilisation ont été évaluées sous  $scCO_2$  pour la réaction de synthèse de l'acétate de géraniol. L'immobilisation de CALB par chimisorption sur des supports siliceux macroporeux avec de l'isocyanate comme greffon a permis une augmentation importante de l'activité par rapport aux autres supports et à l'enzyme CALB commerciale immobilisée sur une résine acrylique. Enfin, l'impact des conditions réactionnelles sur la production de l'undécényl-phénylalanine (un surfactant d'intérêt en cosmétique) par les aminoacylases de *S. ambofaciens* a été évaluée. Le produit de la réaction a été purifié à >99% et l'activité de dépigmentation de la peau a été vérifiée.

## **Intensified and sustainable enzymatic process for amino acids N-acylation in eco-compatible media : characterization, kinetics and immobilization of new biocatalysts**

**Keywords :** Acylase, Lipase, Acylation, immobilization, modeling, intensification

### **Abstract :**

Acylated amino acids are one of the most attractive biobased surfactants for food, cosmetic and pharmaceutical industry regarding their techno-functional and bioactive properties. Those molecules are produced at industrial scale by using Schotten-Baumann chemical method which is a very productive way but non-specific and have a negative impact on the environment. Enzymatic catalysis is one of the most promising alternatives. The aim of this work was to find the best enzymatic way for the N-acylation of amino acids in green solvent. The first step was to select the couple enzyme / reactional medium enabling the implementation of this reaction. Aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens* in aqueous medium showed the best N-acylation specificity towards the amino acids and the acyl donors with some correlating between the structure of the substrates and the catalytic performances compared to CALB which doesn't show any N- $\alpha$ -acylation activity. The addition of cobalt to the reaction medium allowed an acceleration of the reaction rate and an increase of the activity. In a second time, the activity of the different enzymes was evaluated after the immobilization on various supports. The aminoacylases immobilized on SBA-15 functionalized with APTES showed the best performances compared to the use of the others supports but a decrease of the activity compared to the free enzymes was observed. In the case of CALB, the covalent immobilization using isocyanate as grafting agent on the macroporous silica material allowed a significant improvement of the catalytic performance under  $scCO_2$  even better than the commercial immobilized CALB. Lastly, the operational condition affecting the aminoacylases activity for the synthesis of undecenyl-phenylalanine, a product with cosmetic interest, was evaluated. The product of the reaction was purified to >99% and the skin depigmentation activity was checked.