



NOTE DE RECHERCHE

SEPTEMBRE 2015 • V.2, N°9.

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

représente une candidate potentielle pour le contrôle du «pitch».



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

I. MÉTHODOLOGIE

Criblage et identification de la souche bactérienne

Une souche d'*Aneurinibacillus thermoaerophilus* thermophile a été isolée à partir de compost de fumier de mouton. Cette souche a montré une activité lipase à 50 °C sur gélose contenant de l'huile d'olive¹.

Clonage et production de la lipase (LipAT)

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

Purification de la protéine recombinante LipAT

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

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

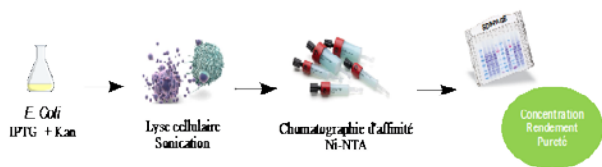


Figure 2. Schématisation des étapes de la production et purification de LipAT.

Détection de l'activité lipase à haute température

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

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Clonage et production de la lipase LipAT

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

Purification de LipAT

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

Détection de l'activité enzymatique à haute température

Des tests de détection d'activité de la protéine purifiée ont été réalisés à haute température sur boîte de pétri contenant des triglycérides à longue (C16-C18) et courte chaîne (C4). Ces tests ont permis de mesurer la capacité de l'enzyme LipAT à hydrolyser des lipides à haute température, donc son potentiel pour le traitement des

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

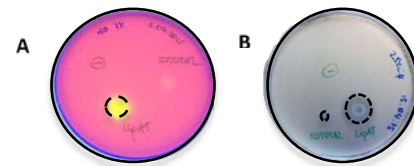


Figure 3. Détection de l'activité enzymatique de LipAT à 50°C. A) Huile d'olive. B) Glycéryltributyrate.

III. CONCLUSIONS

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

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

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

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

Pour plus d'informations: Marc Beaugard, professeur titulaire

Marc.Beaugard@uqtr.ca

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

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

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

www.materiauxrenouvelables.ca