



**HAL**  
open science

# Séparation par voie enzymatique d'énantiomères de profènes : optimisation du biocatalyseur et mise en oeuvre en dioxyde de carbone supercritique

Doriane Gérard

► **To cite this version:**

Doriane Gérard. Séparation par voie enzymatique d'énantiomères de profènes : optimisation du biocatalyseur et mise en oeuvre en dioxyde de carbone supercritique. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2016. Français. NNT : 2016INPT0098 . tel-04259498

**HAL Id: tel-04259498**

**<https://theses.hal.science/tel-04259498v1>**

Submitted on 26 Oct 2023

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**

Génie des Procédés et de l'Environnement

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme DORIANE GERARD

le mercredi 23 novembre 2016

**Titre :**

Séparation par voie enzymatique d'énantiomères de profènes :  
optimisation du biocatalyseur et mise en oeuvre en dioxyde de carbone  
supercritique

---

**Ecole doctorale :**

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. JEAN STEPHANE CONDORET

M. ALAIN MARTY

**Rapporteurs :**

M. ERIC DUBREUCQ, MONTPELLIER SUPAGRO

M. PEDRO LOZANO RODRIGUEZ, UNIVERSITE DE MURCIA

**Membre(s) du jury :**

Mme CATHERINE HUMEAU, UNIVERSITE DE LORRAINE, Président

M. ALAIN MARTY, INSA TOULOUSE, Membre

M. JEAN STEPHANE CONDORET, INP TOULOUSE, Membre

Mme SEVERINE CAMY, INP TOULOUSE, Membre

Mme SOPHIE DUQUESNE, INSA TOULOUSE, Membre

M. YANN GUIAVARCH, UNIVERSITE DE LORRAINE, Membre



## Résumé

La séparation de deux énantiomères est un procédé d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique. En effet, souvent un seul des énantiomères exerce l'activité biologique requise. Cette problématique est abordée ici par l'utilisation d'enzymes énantiosélectives qui est une alternative intéressante aux méthodes conventionnelles (chromatographie chirale, synthèse asymétrique ou cristallisation). Cette approche a été mise en œuvre pour les molécules de la famille des profènes (l'Ibuprofène, le Kétoprofène ou le Naproxène par exemple) qui sont des acides 2-arylpropioniques et constituent une classe importante de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Tout d'abord, un travail de recherche dans le domaine de la catalyse enzymatique et de l'ingénierie d'enzymes a été effectué. Des enzymes aux potentialités prometteuses, issues de la levure *Yarrowia lipolytica*, pour la résolution de ces trois anti-inflammatoires ont été identifiées. S'appuyant sur la modélisation moléculaire, l'ingénierie moléculaire a été utilisée pour accéder à des enzymes performantes tant du point de vue de la sélectivité que de l'activité. Les réactions ont été réalisées conventionnellement dans un système diphasique *phase aqueuse/décane* car les profènes et les esters associés sont des substrats hydrophobes et très faiblement solubles dans l'eau, la réaction doit donc être effectuée dans un solvant apolaire en contact avec une phase aqueuse où l'enzyme libre est dissoute. Ce mode opératoire permet d'éviter une immobilisation de l'enzyme. Une enzyme pour chaque substrat avec une énantiosélectivité suffisante a pu être développée, à savoir Lip2p V232A pour l'ibuprofène, V235S pour le naproxène et V232F pour le kétoprofène. Les lipases de *Candida rugosa* se sont également avérées intéressantes pour la résolution des profènes mais moins que les lipases précédemment évoquées.

Le deuxième aspect de cette thèse s'est intéressé à la mise œuvre de cette technique de résolution enzymatique dans un procédé innovant de Chimie Verte où le dioxyde de carbone supercritique (CO<sub>2</sub>SC) remplace le décane. En effet, les solvants organiques tels que le décane peuvent être toxiques mais aussi difficiles à éliminer, à la fin du processus, ce qui conduit à des étapes fastidieuses et coûteuses de purification.

Dans un premier temps l'étude a porté sur la résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique par l'hydrolyse de son ester octylique (ester + eau  $\rightleftharpoons$  acide (profène) + alcool).

L'acidification de la phase aqueuse en contact avec  $\text{CO}_2\text{SC}$  (formation d'acide carbonique) s'est montrée préjudiciable pour obtenir des conversions élevées. Cet inconvénient a été atténué en utilisant des concentrations assez élevées de sels ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pour tamponner la phase aqueuse. Une étude spécifique en cellule haute pression utilisant des sondes solvatochromiques a permis d'établir que l'utilisation de concentrations élevées de sels (de l'ordre de 1000 mmol/L) permettait de maintenir un pH de l'ordre de 6. Dans ces conditions, des conversions élevées ont pu être obtenues pour des temps de réactions de l'ordre de 100 h.

Cependant la cinétique s'est avérée plus lente par rapport à celle observée avec le décane. L'explication de cette différence n'est pas encore totalement élucidée mais deux pistes ont été privilégiées : la formation de carbamates dues aux interactions entre le  $\text{CO}_2\text{SC}$  et les acides aminés composant l'enzyme ou une mauvaise ouverture du volet moléculaire qui recouvre le site actif de l'enzyme liée à la moindre hydrophobicité du  $\text{CO}_2\text{SC}$  hydraté.

Cette résolution énantiomérique a également été mise en œuvre dans un système sans phase aqueuse en utilisant l'enzyme sous sa forme immobilisée sur support solide en utilisant la réaction réverse, l'estérification.

Utilisant les mêmes approches, la résolution énantiomérique de l'ibuprofène a également été réalisée. Les meilleurs résultats obtenus en système diphasique *phase aqueuse*/ $\text{CO}_2\text{SC}$  permettent en 75 heures une résolution quasi-totale.

## Summary

The separation of the two enantiomers (or enantiomeric resolution) is a process of interest to the pharmaceutical industry. Indeed, very often, only one of the enantiomers has the required biological activity. This issue is addressed here by the use of enantioselective enzymes which is an interesting alternative to conventional methods (chiral chromatography, asymmetric synthesis, crystallization). This approach has been implemented for separation of molecules of the profens family (Ibuprofen, Naproxen or Ketoprofen for example) that are 2-arylpropionic acids and are an important class of anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

One first aspect of this work was to use molecular modeling and molecular engineering to identify enzymes, from the yeast *Yarrowia lipolytica*, with promising potential from the point of view of selectivity and activity. Reactions were carried out conventionally in a biphasic *aqueous phase/decane* system since the profens and related esters are hydrophobic substrates and very sparingly soluble in water so that the reaction must be carried out in an apolar solvent in contact with an aqueous phase where the enzyme is dissolved. This procedure avoids immobilization of the enzyme. An enzyme with good enantioselectivity for each substrate was developed, namely Lip2p V232A for ibuprofen, V235S for naproxen and V232F for ketoprofen. Lipases of *Candida rugosa* also proved useful for the resolution of ibuprofen, naproxen and ketoprofen but were less efficient than the lipases mentioned above.

The second aspect of this thesis focused to the implementation of this enzymatic resolution technology in an innovative process for Green Chemistry where decane was replaced by supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>). Indeed, organic solvents such as decane may be toxic but also difficult to remove at the end of the process, which leads to cumbersome and costly purification steps.

Initially the study focused on enzymatic resolution of 2-bromo phenyl acetic acid by hydrolysis of its octyl ester (ester + water  $\rightleftharpoons$  acid (profen) + alcohol). Acidification of the aqueous phase in contact with scCO<sub>2</sub> (formation of carbonic acid) proved to be detrimental to obtain high conversions. This disadvantage was mitigated by using relatively high concentrations of salts (1000 mmol/L) to buffer the aqueous phase. A specific study in a high

pressure cell using solvatochromic probes showed that the use of high concentrations of salts allowed maintaining a pH of about 6. In these conditions, high conversions could be obtained for reaction times of 100 hours.

However kinetics proved to be slower compared to those observed using decane as the organic phase. The explanation for this difference is not yet fully understood but two hypotheses can be evoked: formation of carbamates due to interactions between the  $scCO_2$  and amino acids or a bad opening of the "lid" that covers the active site related to a lower hydrophobicity of hydrated  $scCO_2$ .

This enantiomeric resolution was also implemented in a non-aqueous phase system using the enzyme in its immobilized form on a solid support, using the reverse reaction: esterification of profen.

Using the same approach, the enantiomeric resolution of ibuprofen was also carried out. Best results using *aqueous phase/scCO<sub>2</sub>* system allowed total resolution within 75 hours.

## Liste des Publications et Communications

### Publications :

D. Gérard, F. Currie, Y. Medina-Gonzalez, S. Camy, A. Marty, J.S. Condoret. "Resolution of 2-bromo-arylacetic acid ester by *Yarrowia lipolytica* lipase in Water/Supercritical CO<sub>2</sub> two-phase systems" *Journal of Supercritical Fluids*, 2017, 121, 96-104.

D. Gérard, M. Guérault, L. Casa-Godoy, J.S. Condoret, I. André, A. Marty, S. Duquesne. "Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered *Yarrowia lipolytica* Lip2p lipase." Soumise au journal : *Tetrahedron: Asymmetry*.

D. Gérard, H. Casajus, J. L. Petit, A. Marty, V. De Berardinis and S. Duquesne. "Screening of a semi-rational lipases library for the resolution of racemic esters of arylalkyl carboxylic." En cours de soumission.

### Communications orales lors de congrès :

D. Gérard, Y. Medina-Gonzalez, S. Camy, A. Marty, J.S. Condoret. "Enzymatic enantiomeric resolution in supercritical CO<sub>2</sub>" ECCE10, congrès international sur les procédés, 27 Septembre au 1<sup>er</sup> Octobre 2015, Nice, France.

D. Gérard, M. Guérault, J.S. Condoret, I. André, S. Duquesne, A. Marty. "Résolution efficace d'esters racémiques d'intérêt pharmaceutique par la lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica* et ses variants" AdebioTech, Lipinov, congrès national sur les lipases et lipides, 23-24 Novembre 2015, Romainville, France.

D. Gérard, Y. Medina-Gonzalez, S. Camy, A. Marty, J.S. Condoret. "Biocatalysis in aqueous-supercritical CO<sub>2</sub> two phase system" EMSF, congrès international sur le CO<sub>2</sub> supercritique, 8-11 Mai 2016, Essen, Allemagne.





## Remerciements

Cette thèse était intense et prenante, si c'était à refaire je le referais sans aucune hésitation d'une part pour le sujet qui était très intéressant et riche mais également pour toutes ces merveilleuses rencontres.

Comme c'est le cas pour de nombreux « thésards » les directeurs de thèse ont pris une place très particulière dans ma vie.

Je voudrais tout d'abord commencer par chaleureusement remercier mon mentor durant cette thèse, Alain Marty tant pour ses très nombreux apports scientifiques que pour le temps qu'il a passé pour améliorer le mémoire ainsi que les différentes publications issues de ces travaux. J'ai énormément appris de choses durant cette thèse, scientifiquement mais aussi humainement et Alain y est pour beaucoup. Alain est rassurant, honnête, souriant, intelligent, humain et essentiel pour cette thèse.

Je tiens également à remercier mon second mentor, Jean-Stéphane Condoret qui co-encadrait cette thèse. Un grand diplomate et un psychorigide de la forme qui m'a également beaucoup appris et soutenu durant ces trois années. Je ne suis pas certaine de retransmettre ce que tu m'as appris avec autant de patience et diplomatie mais je suis en bonne voie pour être pénible sur la forme.

Je voudrais ensuite remercier Severine Camy et Sophie Duquesne qui ont été examinatrices de cette thèse et qui ont surtout été très impliquées et ont apporté beaucoup dans ces travaux de recherche.

Je remercie également Catherine Humeau qui était la présidente du jury et ancienne enseignante pendant mes études d'ingénieur. Mais aussi je remercie Pedro Lozano, Eric Dubreucq qui étaient rapporteurs de cette thèse et Yann Guiavarc'h, examinateur, pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de mon travail et pour la discussion qui a suivi l'oral le jour de la soutenance.

Ma reconnaissance va également à Yaocihuatl Medina Gonzalez pour ses précieux conseils.

Cette thèse a également été très fructueuse grâce à de nombreuses collaborations, notamment je tiens à remercier Jean-Louis Petit, Adrien Debard, Virginie Pellouin, Véronique De Berardinis, Marc Gueroult et Isabelle Andre pour leur aide très précieuse.

Trois personnes m'ont aidé pour effectuer les expérimentations, Hubert Casajus, Fiona Currie et Maria-Laura Goni que je remercie du fond du cœur.

Mes remerciements vont aussi à Jean-Louis Labat, Alec Maunoury et Bruno Boyer pour leur aide technique sur le réacteur sous pression.

## Remerciements

---

Ma thèse était soutenue par deux laboratoires et au sein du LGC je souhaite notamment remercier Mylène (merci d'avoir relu en partie ma thèse), Claudia (une co-bureau exceptionnelle), les joueurs de tarot : Léo, Kevin, Benoit, Claire, Hélène, Fatine, Omar, Emanuel, Pierre et aussi Juan, Giovanni, Schehinez, Flavie et Alain.

Au sein du LISBP j'ai une pensée particulière pour Florence, Angeline, Marie-Laure, Lisa, Barbara, Louise, Hélène, Coraline, Marie, Dana, Vinciane (The chimiste au LISBP), Emilie, Benjamin, Maher, Julien, Nathalie, Sylvie, Nelly et Etienne (merci sur l'immobilisation notamment).

Ces travaux n'aurait pas été permis sans l'aide de l'Université Fédérale de Toulouse et la Région Midi-Pyrénées qui ont financé cette thèse et que je remercie sincèrement.

Mes remerciements vont aussi à ma famille, parents, grands parents, frères et ma soeur. Leur présence et leurs encouragements sont pour moi les piliers indispensables dans ma vie.

Pour finir je remercie le docteur Alexandre Martin pour son soutien et le bonheur qu'il apporte dans ma vie.

## Table des matières

Résumé.....	3
Summary .....	5
Liste des Publications et Communications.....	7
Publications .....	7
Communications orales lors de congrès .....	7
Remerciements .....	9
Table des matières .....	11
Index des figures .....	17
Index des tableaux.....	21
Index des équations .....	23
Abréviations .....	25
Nomenclature.....	27
Introduction.....	29
<b>Chapitre I : Etude Bibliographique.....</b>	<b>35</b>
1.1. Réaction étudiée : résolution de mélanges racémiques.....	37
1.1.1. La chiralité .....	37
1.1.2. Les méthodes classiques d'obtention d'un énantiomère pur .....	40
1.1.2.1. Utilisation de précurseurs chiraux (pool chiral) .....	40
1.1.2.2. Utilisation de substances prochirales, synthèses asymétriques .....	40
1.1.2.3. La résolution de mélanges racémiques.....	42
1.1.3. Calcul de l'énantiosélectivité .....	45
1.1.4. Hydrolyse / estérification .....	46
1.2. Enzymes : les lipases.....	47
1.2.1. Généralités sur les lipases .....	47
1.2.1.1. Les substrats et réactions catalysés .....	48
1.2.1.2. Repliement $\alpha/\beta$ .....	48
1.2.1.3. La triade catalytique .....	51
1.2.1.4. Le phénomène d'activation interfaciale.....	51
1.2.1.5. Le volet moléculaire .....	52
1.2.1.6. Le trou oxyanion .....	54
1.2.1.7. Le mécanisme d'action.....	55

1.2.2.	<i>Candida rugosa</i> .....	56
1.2.3.	<i>Yarrowia lipolytica</i> .....	57
1.2.3.1.	Généralités .....	57
1.2.3.2.	Les lipases de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	58
1.2.3.3.	Lip2p de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	58
1.2.4.	Immobilisation.....	59
1.3.	Evolution génétique.....	61
1.3.1.	Les méthodes d'évolution génétique.....	61
1.3.1.1.	L'évolution dirigée .....	61
1.3.1.2.	La voie rationnelle .....	61
1.3.1.3.	La voie semi-rationnelle .....	62
1.3.2.	Les mutations de Lip2p .....	62
1.3.3.	<i>Y. lipolytica</i> comme système d'expression.....	63
1.4.	Les acides 2-substitués .....	65
1.4.1.	Généralités sur les profènes.....	65
1.4.2.	L'ibuprofène .....	65
1.4.3.	Le naproxène .....	66
1.4.4.	Le kétoprofène .....	67
1.4.5.	Les autres profènes .....	67
1.4.6.	Les acides 2-halogéno-carboxyliques.....	68
1.5.	Procédé en CO <sub>2</sub> supercritique .....	69
1.5.1.	Généralités sur les fluides supercritiques .....	69
1.5.2.	Le CO <sub>2</sub> supercritique.....	72
1.5.3.	La biocatalyse en CO <sub>2</sub> supercritique.....	73
1.5.3.1.	Les profènes en CO <sub>2</sub> supercritique .....	74
1.5.3.2.	Rôle de l'eau et activité de l'eau .....	75
1.5.3.3.	La masse volumique .....	76
1.5.3.4.	Les carbamates.....	77
1.5.3.5.	Pression et cycle de pressurisation et dépressurisation .....	77
1.5.3.6.	La constante diélectrique et le log P .....	78
1.5.3.7.	La température.....	79
1.5.3.8.	Procédé en diphasique.....	79

<b>Chapitre II : Recherche d'enzymes énantiosélectives pour la résolution de profènes</b> .....	85
2.1. Introduction Chapitre II .....	87
2.2. Recherche d'enzymes énantiosélectives pour la résolution des esters éthyliques de l'ibuprofène, du naproxène et du kétoprofène .....	88
2.2.1. Introduction de la publication.....	88
2.2.2. Publication : Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered <i>Yarrowia lipolytica</i> Lip2p lipase.....	89
2.2.3. Conclusion de la publication .....	115
2.2.3.1. Isoformes des lipases de <i>Candida rugosa</i> .....	115
2.2.3.2. Résolution de l'éthyl ibuprofène.....	115
2.2.3.3. Résolution de l'éthyl naproxène.....	115
2.2.3.4. Résolution de l'éthyl kétoprofène.....	116
2.2.4. Annexe : Arrêt de la réaction .....	116
2.3. Screening d'une librairie de mutants semi-rationnelle pour la résolution de mélanges racémiques.....	119
2.3.1. Introduction de la publication.....	119
2.3.2. Publication : Screening of a semi-rational lipases library for the resolution of racemic esters of arylalkyl carboxylic acids.....	120
2.3.3. Conclusion de la publication .....	143
2.4. Conclusion Chapitre II.....	143
<b>Chapitre III : Résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique</b> .....	145
3.1. Introduction Chapitre III .....	147
3.2. Estérification de l'acide 2-bromo phényl acétique par Lip2p V232S de <i>Yarrowia lipolytica</i> en système monophasique décane .....	149
3.2.1. Immobilisation.....	150
3.2.1.1. Composition des supports solides.....	150
3.2.1.2. Protocole d'immobilisation .....	151
3.2.1.3. Optimisation des conditions d'immobilisation.....	153
3.2.2. Réaction d'estérification avec l'enzyme immobilisée.....	155
3.3. Hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique par Lip2p de <i>Yarrowia lipolytica</i> (système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> et <i>phase aqueuse/CO<sub>2</sub> supercritique</i> ).....	156
3.3.1. Introduction de la publication.....	156

3.3.2.	Publication : Resolution of 2-bromo-arylacetic acid ester by <i>Yarrowia lipolytica</i> lipase in water/supercritical CO <sub>2</sub> two-phase systems.....	158
3.3.3.	Conclusion de la publication .....	169
3.3.4.	Annexes .....	170
3.3.4.1.	Effet de la dialyse du surnageant de culture.....	170
3.3.4.2.	Formation de carbonates .....	171
3.3.4.3.	Utilisation de tensio-actifs.....	172
3.4.	Hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique par la lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	175
3.4.1.	Influence de la pression en présence de la lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	175
3.4.2.	Lipase de <i>Candida rugosa</i> vs lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	176
3.4.3.	Effet de la polarité.....	177
3.5.	Conclusion Chapitre III.....	179
<b>Chapitre IV : Résolution de l'ibuprofène</b> .....		<b>181</b>
4.1.	Introduction Chapitre IV .....	183
4.2.	Estérification de l'ibuprofène en système monophasique (décane et CO <sub>2</sub> SC) .....	184
4.2.1.	Estérification de l'ibuprofène en système monophasique décane .....	184
4.2.1.1.	Estérification éthylique de l'ibuprofène en système monophasique décane.....	184
4.2.1.2.	Estérification octylique de l'ibuprofène en système monophasique décane .....	185
4.2.1.3.	Estérification de l'ibuprofène en système monophasique décane dans le réacteur .....	191
4.2.2.	Estérification de l'ibuprofène en système monophasique CO <sub>2</sub> SC.....	192
4.2.3.	Conclusion : estérification en système monophasique .....	194
4.3.	Estérification de l'ibuprofène en système diphasique ( <i>phase aqueuse/décane</i> et <i>phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC</i> ) .....	194
4.3.1.	Etude du système <i>phase aqueuse/décane</i> en tube Eppendorf .....	195
4.3.1.1.	Précipitation de l'ibuprofène.....	195
4.3.1.2.	Détermination de la quantité optimale d'alcool pour l'estérification diphasique de l'ibuprofène .....	195
4.3.2.	Etude du système <i>phase aqueuse/décane</i> ou <i>phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC</i> en réacteur .....	199
4.3.2.1.	Estérification éthylique de l'ibuprofène.....	199
4.3.2.2.	Estérification octylique de l'ibuprofène .....	200
4.3.3.	Conclusion : estérification en système diphasique.....	201

4.4. Comparaison systèmes monophasique et diphasique pour l'estérification de l'ibuprofène .....	201
4.5. Conclusion Chapitre IV.....	203
Conclusion et Perspectives.....	205
Références.....	215





## Index des figures

Figure 1 : Principe de la chiralité .....	37
Figure 2 : Pourcentage de nouvelles entités moléculaires approuvées par la FDA et dans le monde sous forme d'un seul énantiomère, sous forme de racémique ou de molécules achirales (Agranat et al., 2012) .....	39
Figure 3 : Voies d'obtention d'un énantiomère pur (Sheldon, 1993).....	40
Figure 4 : Synthèse d'un énantiomère pur à partir de réactifs prochiraux et auxiliaires chiraux (Crosby, 1992) .....	41
Figure 5 : Synthèse du ( <i>S</i> ) naproxène, procédé Zambon (R. Schaad, 1999) à partir du 1-(bromo 6-methoxy 2-naphtyl)-1 propanone et de l'acide tartrique.....	41
Figure 6 : Réaction d'hydrolyse d'un ester et réaction inverse l'estérification d'un acide .....	47
Figure 7 : Image simplifiée du repliement 3D des hydrolases d'après le schéma de Jaeger et al., 1999 .....	49
Figure 8 : Schéma du repliement $\alpha/\beta$ de quatre lipases représentatives de quatre familles de lipases.....	50
Figure 9 : Comparaison entre une estérase et une lipase (Sarda and Desnuelle, 1958).....	52
Figure 10 : Formes des lipases, active et inactive, dues à la présence du volet moléculaire (Maruyama et al., 2000).....	53
Figure 11 : Illustration des deux types de trous oxyanions retrouvés chez les lipases .....	55
Figure 12 : Mécanisme d'action des lipases (Cygler et al., 1994) .....	56
Figure 13 : Molécules d'intérêt .....	65
Figure 14 : Réaction de transestérification effectuée dans la publication de Guieysse et al., 2004.....	68
Figure 15 : Diagramme de phases du CO <sub>2</sub> .....	70
Figure 16 : Cellule d'observation permettant la visualisation du passage à l'état supercritique (Hobbs and Thomas, 2007) .....	70
Figure 17 : Solubilité de l'eau dans le CO <sub>2</sub> SC.....	76
Figure 18 : Distribution de l'eau et du CO <sub>2</sub> à la surface de la lipase de <i>C. antarctica</i> (Silveira et al., 2012).....	76
Figure 19 : Densité du CO <sub>2</sub> en fonction de la pression et température.....	77
Figure 20 : Formation de carbamate, réaction entre une lysine et le CO <sub>2</sub> .....	77
Figure 21 : Constante diélectrique du CO <sub>2</sub> en fonction de la pression et température .....	79
Figure 22 : Formation d'acide carbonique et sa dissociation .....	81
Figure 23 : La solubilité du CO <sub>2</sub> dans l'eau en fonction de la pression et de la température (Ziegler et al., 2003).....	81
Figure 24 : pH en fonction de la pression d'un système diphasique <i>eau/CO<sub>2</sub></i> à 32 °C (Meyssami et al., 1992) .....	82
Figure 25: Hydrolyse de l'éthyl ibuprofène par Lip2p V232A en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> .....	117

Figure 26 : Hydrolyse de l'éthyl naproxène par lip2p V235S et V235L en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> .....	117
Figure 27 : Représentation schématique de l'expérience consistant à mettre en contact une phase organique, contenant l'éthyl naproxène, avec un surnageant de culture (contenant Lip2p V235S) pendant 100 h puis le remplacer par un second surnageant de culture (contenant Lip2p V235S).....	118
Figure 28 : Principe de la méthode de construction semi-rationnelle d'une banque de mutants destinée à la résolution de racémiques.....	120
Figure 29 : Montage expérimental, appareillage sous haute pression.....	148
Figure 30 : Principe de l'immobilisation et de détermination de la quantité d'enzyme immobilisée .....	151
Figure 31 : Méthode d'activation des supports de type Accurel <sup>®</sup> MP .....	152
Figure 32 : Equilibrage de l' $a_w$ de l'enzyme immobilisée .....	152
Figure 33 : Activité enzymatique restante (U/mL) dans le surnageant au cours du temps, lors de l'immobilisation, en fonction du ratio initial U d'enzyme/mg de support .....	154
Figure 34 : Activité de l'enzyme (U) chargée sur différents supports en fonction du ratio initial U d'enzyme/mg de support.....	155
Figure 35 : Réaction d'estérification énantiosélective de l'acide 2-bromo phényl acétique	156
Figure 36 : Effet de la dialyse du surnageant de culture sur la réaction en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> et <i>phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC</i> .....	171
Figure 37 : Effet des surfactants sur l'hydrolyse du (S) ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique en diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> par Lip2p V232S.....	173
Figure 38 : Comparaison des performances de la lipase provenant de <i>C. rugosa</i> (CRL) et Lip2p V232S provenant de <i>Y. lipolytica</i> pour l'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique en système diphasique.....	177
Figure 39 : Effet de l'augmentation de la polarité de la phase organique sur l'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique par la lipase de <i>C. rugosa</i> en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> .....	178
Figure 40 : Réaction, estérification énantiosélective de l'ibuprofène par Lip2p V232A de <i>Y. lipolytica</i> .....	184
Figure 41 : Estérification octylique du (S) ibuprofène en utilisant Lip2p V232A immobilisée en système monophasique décane.....	186
Figure 42 : Effet de la concentration initiale en octane-1-ol sur la vitesse initiale d'estérification du (S) ibuprofène .....	190
Figure 43 : Effet de la concentration initiale de (R, S) ibuprofène sur les vitesses initiales d'estérification octylique du (S) ibuprofène .....	190
Figure 44 : Estérification octylique du (S) ibuprofène en système monophasique décane ..	192
Figure 45 : Estérification éthylique du (S) ibuprofène en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> en fonction de la molarité en éthanol.....	196
Figure 46 : Estérification octylique du (S) ibuprofène en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> en fonction de la molarité en octane-1-ol.....	197

---

Figure 47 : Influence du type d'alcool sur l'estérification du (S) ibuprofène en diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> .....	198
Figure 48 : Estérification éthylique de l'ibuprofène par Lip2p V232A en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> et <i>phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC</i> .....	199
Figure 49 : Estérification octylique de l'ibuprofène par Lip2p V232A en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> et <i>phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC</i> .....	201
Figure 50 : Estérification octylique de l'ibuprofène en système diphasique <i>phase aqueuse/décane</i> ou en système monophasique décane.....	202



## Index des tableaux

Tableau 1 : Effet biologique des deux énantiomères de différents composés.....	38
Tableau 2 : Proportion en isoenzymes dans les mélanges commerciaux et l'effet de la source de carbone comme inducteur (Domínguez De María et al., 2006) .....	57
Tableau 3 : Ordre de grandeur de la densité, viscosité et diffusivité des gaz, liquides et fluides supercritiques.....	71
Tableau 4 : Masse moléculaire, température critique et pression critique de différents solvants (Samvura and Totté, 2006) .....	72
Tableau 5 : Valeurs expérimentales du pH pour différents tampons, en fonction de la température et de la pression (Holmes et al., 1999).....	83
Tableau 6 : Expérimentations étudiées de ce chapitre.....	149
Tableau 7 : Liste des références des supports testés pour l'immobilisation de Lip2p V232S150	
Tableau 8 : Composition des cinq supports testés pour l'immobilisation de Lip2p V232S...	151
Tableau 9 : Effet de la dialyse du surnageant de culture sur l'activité <i>p</i> NPB du surnageant	171
Tableau 10 : Activité <i>p</i> NPB de Lip2p de <i>Y. lipolytica</i> et de la lipase de <i>C. rugosa</i> .....	176
Tableau 11 : Expérimentations réalisées dans ce chapitre.....	184
Tableau 12 : Conditions expérimentales de l'estérification éthylique de l'ibuprofène en système monophasique décane.....	185
Tableau 13 : Conditions expérimentales de l'estérification octylique de l'ibuprofène en système monophasique décane.....	185
Tableau 14 : Comparaison de l'estérification octylique énantiosélective de l'ibuprofène par le mutant Lip2p V232A immobilisé .....	187
Tableau 15 : Vitesses initiales ( <i>v<sub>i</sub></i> ) en fonction de la concentration initiale en octane-1-ol..	188
Tableau 16 : Vitesses initiales ( <i>v<sub>i</sub></i> ) en fonction de la concentration initiale en ( <i>S</i> ) ibuprofène .....	188
Tableau 17 : Modèle ping-pong Bi Bi ajusté à l'estérification du ( <i>S</i> ) ibuprofène catalysé par Lip2p V232A immobilisée sur les supports de type Purolite .....	191



---

## Index des équations

Équations 1 : Calcul de l'excès énantiomérique, le taux de conversion et l'énantiosélectivité .....	46
Équation 2 : Calcul de l'activité théorique de l'enzyme immobilisée .....	153
Équation 3 : Equation du modèle Ping-pong Bi Bi .....	189
Équation 4 : Fonction objectif du solveur Excel .....	189





## Abréviations

5M2H : 5-méthyl 2-hexanone

ADN : Acide désoxyribonucléique

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens, NSAIDs : non-steroidal anti-inflammatory drugs

Clea : cross-linked enzyme aggregates

CO<sub>2</sub>SC : dioxyde de carbone à l'état supercritique, scCO<sub>2</sub> : supercritical carbon dioxide

CRL : Lipase de *Candida rugosa*

DKR : dynamic kinetic reaction

EC : "enzyme commission number"

FDA : American Food and Drug Administration

GRAS : Generally Recognized As Safe

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

Lip2p : lipase numéro 2 provenant de *Yarrowia lipolytica*

NME : new molecular entities

PCR : polymerase chain reaction

PDB : protein data bank

*p*NP : *para*-nitrophénol

*p*NPB : *para*-nitrophénolbutyrate

SCWO : supercritical water oxidation

WT : Wild Type, enzyme sauvage



## Nomenclature

[ibu]: concentration (*S*) ibuprofène, en mmol/L

[OH]: concentration en octane-1-ol, en mmol/L

$a_w$  : activité de l'eau (water activity)

E : énantiosélectivité

$ee_s$  : excès énantiomérique du substrat

$ee_p$  : excès énantiomérique du produit

$K_i$  : constante d'inhibition

$K_{Mibu}$ ,  $K_{MOH}$  : constantes cinétiques pour l'ibuprofène et l'octane-1-ol respectivement

P : pression

T : température

$U_A$  : unité d'enzyme contenue dans le surnageant avant immobilisation

$U_B$  : unité d'enzyme contenue dans le surnageant pendant ou après le procédé d'immobilisation

$V_{i(X)}$  : vitesse initiale de conversion de l'énantiomère (*X*) (*R*) ou (*S*)

$V_{max}$  : vitesse maximale



# Introduction



La résolution d'un mélange racémique est un véritable défi dans l'industrie pharmaceutique notamment. En effet lorsqu'une molécule possède un atome (le plus souvent un carbone) asymétrique, c'est-à-dire un atome portant quatre atomes ou groupe d'atomes différents, cela conduit à deux conformations de molécule différentes appelés énantiomères. Ces énantiomères sont images l'un de l'autre dans un miroir plan et ont des propriétés physico chimiques identiques et ne se distinguent que par leur pouvoir rotatoire vis à vis de la lumière (conformations (*R*) ou (*S*)). Ils peuvent avoir cependant des propriétés biologiques très différentes du fait de leur structure tri-dimensionnelle distincte. Par exemple pour le composé thalidomide la conformation (*R*) est un anti-nauséeux et la conformation (*S*) est tératogène. C'est pourquoi la séparation des énantiomères est indispensable pour avoir uniquement la molécule avec l'activité recherchée dans le produit fini et ne pas risquer des effets indésirables dus à l'énantiomère non désiré. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour effectuer la séparation des énantiomères mais les méthodes chimiques classiques sont très complexes et coûteuses. Elles seront décrites plus avant dans ce mémoire. Les catalyseurs d'origine biologique, les enzymes, possèdent généralement une capacité à différencier les énantiomères, une énantiosélectivité, qui est très intéressante dans ce cadre. L'enzyme, si elle est suffisamment sélective, va effectuer la séparation des énantiomères via une réaction sur un seul des deux énantiomères. A la fin de la réaction, appelée catalyse enzymatique, les deux énantiomères seront donc sous deux formes chimiques bien distinctes et faciles à séparer. Cependant l'énantiosélectivité native des enzymes peut ne pas être suffisante pour faire une bonne séparation des énantiomères. Deux stratégies peuvent alors être employées : i) chercher dans la nature une enzyme avec une énantiosélectivité suffisante ou alors ii) améliorer par génie génétique une enzyme possédant une énantiosélectivité insuffisante. Dans cette étude ce seront principalement des lipases, issues des levures *Yarrowia lipolytica* et *Candida rugosa* qui seront considérées.

Dans le cas de substrats hydrophobes, la catalyse enzymatique peut être réalisée dans un solvant organique qui permet de dissoudre ces substrats. Par contre, les enzymes étant très majoritairement insolubles dans de tels solvants, une première stratégie consiste à les immobiliser sur un support solide, généralement poreux, et de mettre alors en œuvre un réacteur de type contacteur solide-liquide, tel qu'un réacteur à lit fixe par exemple. Ce solvant organique en plus d'une certaine toxicité devra être retiré en fin de procédé de



fabrication et cette purification peut être fastidieuse et très coûteuse. C'est pourquoi lors de cette étude nous proposons de considérer sa substitution par un solvant « vert », le dioxyde de carbone à l'état supercritique (CO<sub>2</sub>SC). Le CO<sub>2</sub>SC, du dioxyde de carbone au-delà des conditions critiques (à savoir, pour ce composé pur, température de 31 °C et une pression de 74 bar) sera très facile à retirer à la fin du procédé de synthèse car il suffira d'abaisser la pression, le CO<sub>2</sub> reviendra à l'état gazeux et laissera le produit « propre », dépourvu d'impuretés et de résidus. Cette configuration (enzyme immobilisée et un unique solvant), que nous appellerons ici abusivement « système monophasique » (CO<sub>2</sub>SC seul) a été majoritairement étudiée et proposée dans la littérature. Nous l'étudierons dans ce travail mais nous proposerons de manière plus originale de mettre en œuvre également le système *phase aqueuse*/CO<sub>2</sub>SC (que nous appellerons « système diphasique »), où l'enzyme sera dissoute dans la phase aqueuse. Ainsi, il n'est pas nécessaire d'immobiliser l'enzyme. Dans le but d'étudier correctement ces deux systèmes le système en solvant organique (« mono- » ou « diphasique ») sera effectué en parallèle.

Le Chapitre I aura pour objectif de faire un état de l'art concernant les différentes thématiques de ce travail de thèse (l'énantiosélectivité, les lipases, les substrats étudiés et bien entendu le CO<sub>2</sub>SC).

Le Chapitre II traitera de la recherche d'enzymes efficaces pour la séparation des énantiomères de molécules de la famille des profènes, anti inflammatoires non stéroïdiens (comme l'ibuprofène, le naproxène ou le kétoprofène). L'étude portera particulièrement sur les lipases et variants produits par des levures, *C. rugosa* et *Y. lipolytica*, qui permettent d'effectuer une hydrolyse énantiosélective dans l'objectif de séparer les énantiomères des substrats d'intérêt.

Une fois les enzymes performantes identifiées, la mise en œuvre d'un réacteur permettant l'utilisation du CO<sub>2</sub> supercritique est une étape importante du développement de ce procédé de séparation. Cela constituera la matière des chapitres III et IV : étudier le remplacement des solvants organiques par le CO<sub>2</sub>SC. Ce remplacement entraînera des questionnements sur les différences entre les deux types de solvants et des adaptations pour obtenir des réactions efficaces.

Le Chapitre III propose plus particulièrement l'étude de la résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique (ou son ester octylique associé).

Le Chapitre IV s'intéressera à la résolution de l'ibuprofène.

Comme présenté plus haut, deux configurations seront envisagées, le système « monophasique » (décane ou  $\text{CO}_2\text{SC}$ ), et le système « diphasique » (*phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/ $\text{CO}_2\text{SC}$* ). Deux réactions seront étudiées : l'estérification et l'hydrolyse. Rappelons que dans le cas du système monophasique l'enzyme n'est pas solubilisée dans une phase aqueuse et de ce fait sera immobilisée sur un support. La recherche du support le plus adapté fera partie intégrante du travail.



# **Chapitre I : Etude Bibliographique**



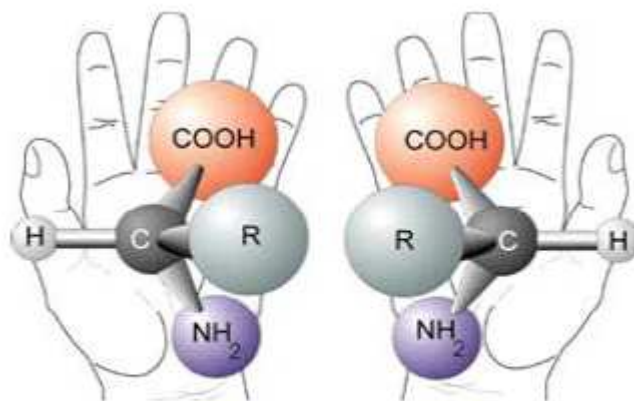
## Chapitre I : Etude bibliographique

### 1.1. Réaction étudiée : résolution de mélanges racémiques

#### 1.1.1. La chiralité

Le terme chiralité trouve son origine étymologique dans le mot grec *chyros*, qui signifie main. La chiralité est la propriété de tout objet qui n'est pas superposable à son image dans un miroir plan. Nos deux mains par exemple sont images l'une de l'autre et ne sont pas superposables.

De même lorsqu'un carbone (ou un autre élément, mais le plus courant est l'atome de carbone) porte quatre atomes (ou groupe d'atomes) différents, leur disposition dans l'espace donne deux molécules différentes, non superposables à leur image dans un miroir plan. Dans ce cas, le carbone est dit chiral et les deux molécules sont des énantiomère (*R*) et (*S*), du latin *enantios* qui signifie « opposé » (Figure 1).



## Enantiomères

Figure 1 : Principe de la chiralité

Les propriétés physiques des deux énantiomères (masse molaire, polarité, charge électrique, hydrophobicité, point de fusion...) sont identiques à l'exception de leur pouvoir rotatoire. L'énantiomère qui provoque une rotation de la lumière vers la droite est dit dextrogyre (du latin dexter qui signifie droit), celui qui la dérive vers la gauche est dit lévogyre (du latin laevus qui signifie gauche), (*R*, *S*) pour « *Rectus*, droit » ou « *Sinister*, gauche » (nomenclature officielle de Cahn-Ingold-Prelog). En raison de cette activité optique, les énantiomères sont souvent appelés isomères optiques. Un mélange équimolaire de molécules lévogyres et

dextrogyres est optiquement inactif et est appelé mélange racémique. La chiralité est une notion très importante, en effet la différence de structure entre les énantiomères peut être cruciale pour leur activité biologique. Les formes (*R*) et (*S*) d'une molécule peuvent avoir des effets physiologiques très différents, dont quelques exemples sont cités dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Effet biologique des deux énantiomères de différents composés

Composés	Configuration absolue	Effets biologiques
Thalidomide	<i>R</i>	Antinauséieux
	<i>S</i>	Tératogène
Ethambutol	<i>R, R</i>	Cécité
	<i>S, S</i>	Tuberculostatique
Fluoxétine ( <i>Prozac</i> )	<i>R</i>	Antidépresseur
	<i>S</i>	Anti-migraine prophylactique
Albutérol	<i>R (levulbuterol)</i>	Bronchodilatateur (Asthme)
	<i>S</i>	Spasmogène
Chloramphenicol	<i>R, R</i>	Antibactérien
	<i>S, S</i>	Inactif
Asparagine	<i>R</i>	Sucré
	<i>S</i>	Amère
Acide-2-méthylbutyrique	<i>R</i>	Odeur de sueur et de fromage
	<i>S</i>	Exhale une fine note fruitée

Le Thalidomide a été prescrit comme anti-nauséieux entre 1958 et 1963 sous forme racémique (sous le nom de *Distaval* ou *Contergan*). Ce médicament est à l'origine de l'une des pires tragédies de la médecine. En effet environ dix mille nouveau-nés ont présenté de très graves malformations (phocomélie) suite à l'absorption par leur mère de ce médicament. L'énantiomère (*R*) était le principe actif anti-nauséieux alors que l'énantiomère (*S*) s'est révélé être tératogène. Désormais l'utilisation d'un médicament contenant un mélange racémique (les deux énantiomères en mélange 50/50 %) est fortement contrôlée du point de vue des effets toxicologiques de chacun des énantiomères avant que la composition du médicament ne soit acceptée. La mise en œuvre de procédé pour produire un seul des énantiomères est souvent privilégiée.

L'obtention de molécules chirales pour l'industrie pharmaceutique représentait un marché de 225 milliards d'euros en 2005 (Erb, 2006). De plus comme le montre la Figure 2 le nombre de nouvelles entités moléculaires approuvées sous forme d'un seul énantiomère est toujours supérieur (ou égale en 2009 pour les nouvelles entités moléculaires approuvées par la FDA, Food and Drug Administration) à celui au nombre d'entités approuvées sous forme de racémique (Agranat et al., 2012, 2002; Erb, 2006; Lin et al., 2011).

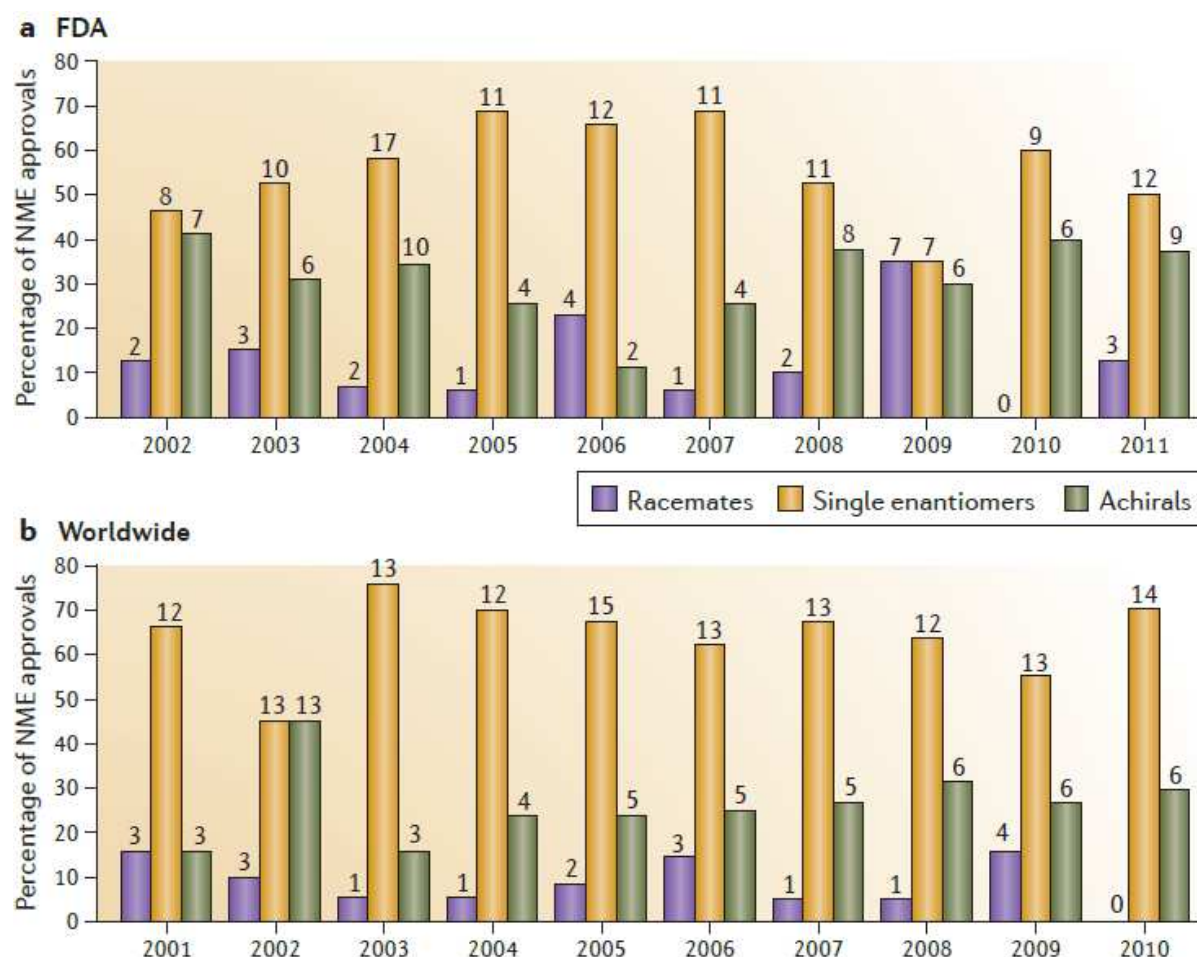


Figure 2 : Pourcentage de nouvelles entités moléculaires approuvées par la FDA et dans le monde sous forme d'un seul énantiomère, sous forme de racémique ou de molécules achirales (Agranat et al., 2012)

a ) Pourcentage de nouvelles entités moléculaires (new molecular entities, NME) et le nombre (chiffre au-dessus des barres) approuvées par US Food and Drug Administration (FDA) entre 2002 et 2011.

b ) Pourcentage de nouvelles entités moléculaires (new molecular entities, NME) et le nombre (chiffre au-dessus des barres) approuvées dans le monde entre 2001 et 2010.

Notons que c'est Louis Pasteur qui le premier en 1848 a accompli la résolution d'un mélange racémique d'acide tartrique, par triage manuel (cf 1.1.2.3). Il existe différentes méthodes pour obtenir un énantiomère à l'état pur. Leur description fera l'objet du prochain paragraphe.



### 1.1.2. Les méthodes classiques d'obtention d'un énantiomère pur

La Figure 3 présente les différentes voies d'obtention d'un racémique pur (Sheldon, 1993).

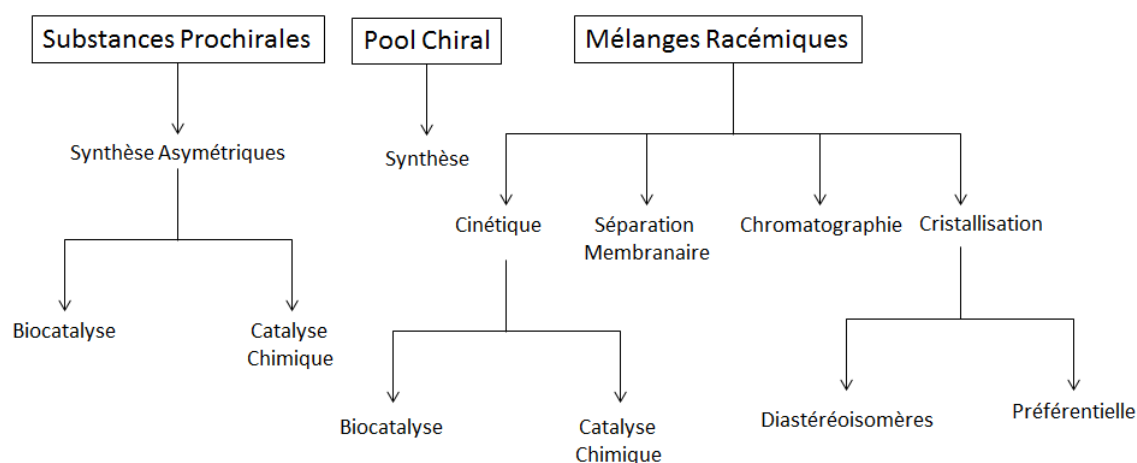


Figure 3 : Voies d'obtention d'un énantiomère pur (Sheldon, 1993)

Il y a trois grandes méthodes pour obtenir un énantiomère pur, la première se fait à partir d'un substrat énantiomériquement pur. La seconde est la synthèse asymétrique qui est réalisée à partir de substances prochirales ou par introduction de la chiralité en cours de synthèse. Et enfin la dernière se fait à partir du mélange racémique et les deux énantiomères sont séparés, on parle de dédoublement ou par anglicisme de « résolution » du racémique (ce sera le terme employé par la suite tout au long de ce document).

#### 1.1.2.1. Utilisation de précurseurs chiraux (pool chiral)

Les substances constituant le pool chiral sont des énantiopures naturels qui servent de précurseurs afin d'obtenir le principe actif énantiopur désiré. Le pool chiral est principalement constitué de produits naturels optiquement actifs, peu coûteux, d'origine végétale, animale ou microbienne. C'est par exemple le cas des acides aminés, des terpènes, des alcaloïdes, les sucres et leurs dérivés ou encore des acides carboxyliques.

#### 1.1.2.2. Utilisation de substances prochirales, synthèses asymétriques

Cette fois la synthèse de composés énantiomériquement purs se fait à partir d'un édifice moléculaire prochiral (cf Figure 4), qui est achiral (il ne possède pas de carbone asymétrique). Elle nécessite l'utilisation d'un réactif chiral adapté, lui-même énantiopur, il

s'agit de l'auxiliaire chiral (a. c.). L'auxiliaire chiral est soit utilisé en quantité catalytique, soit associé au composé qui doit réagir avec le carbone prochiral du substrat. A la fin de la synthèse, l'auxiliaire chiral doit pouvoir être détaché de son support, et récupéré pour être réutilisé. Concrètement, à l'échelle industrielle, on peut citer par exemple, l'utilisation de l'acide tartrique comme auxiliaire chiral pour la synthèse du (*S*) naproxène dans le procédé Zambon (cf Figure 5).

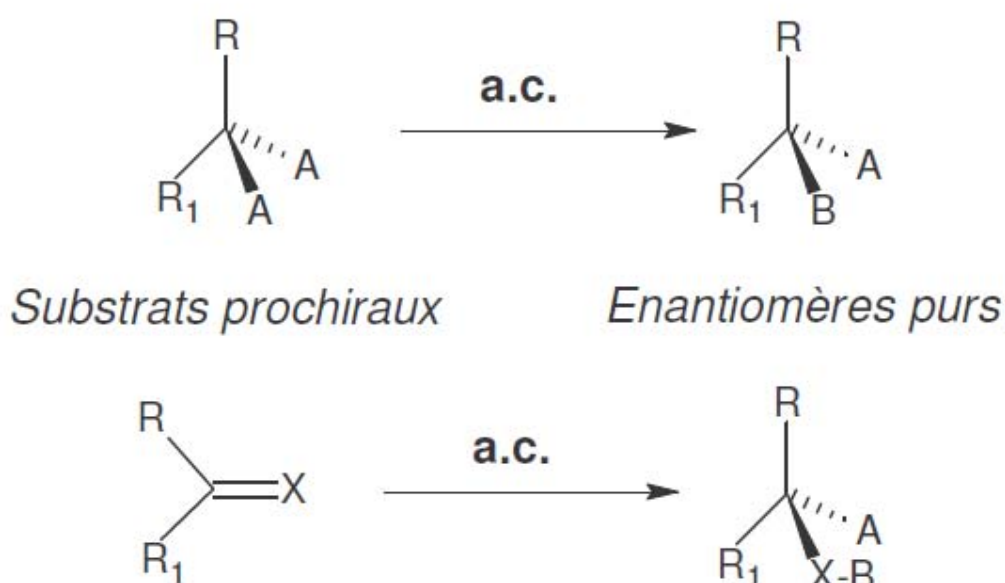


Figure 4 : Synthèse d'un énantiomère pur à partir de réactifs prochiraux et auxiliaires chiraux (Crosby, 1992)

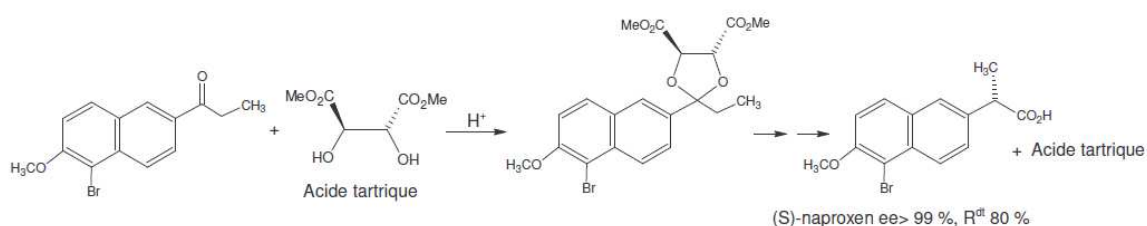


Figure 5 : Synthèse du (*S*) naproxène, procédé Zambon (R. Schaad, 1999) à partir du 1-(bromo 6-méthoxy 2-naphtyl)-1 propanone et de l'acide tartrique

Certaines enzymes, par exemple les décarboxylases sont également capables à partir d'un édifice moléculaire prochiral d'effectuer une synthèse asymétrique pour obtenir un énantiomère pur (Gaßmeyer et al., 2016).

### 1.1.2.3. La résolution de mélanges racémiques

La résolution de mélanges racémiques est, de loin, la méthode la plus utilisée dans l'industrie pour la préparation de composés énantiomériquement pur. Cette méthode consiste à séparer les deux énantiomères et se fait donc à partir du mélange racémique cette fois. La résolution énantiomérique peut être intéressante si l'énantiomère non désiré présente également une valeur, ou si il peut être racémisé en vue d'une résolution ultérieure ou encore mieux si cette racémisation peut être réalisée *in situ*.

Les techniques employées pour la séparation de racémiques sont : i) la cristallisation (préférentielle ou également de sels de diastéréoisomères), ii) la séparation par chromatographie, iii) la séparation membranaire et enfin iv) le dédoublement cinétique. Il y a une cinquième méthode qui peut être utilisée que dans des cas très rares (utilisée en 1948 par Pasteur !). Il s'agit de séparer les énantiomères de façon mécanique ou triage manuel. Cela consiste à dissoudre le mélange racémique dans un solvant adéquat et à le recristalliser. Lorsque les deux énantiomères cristallisent sous deux formes différentes, il est alors possible de les trier sous microscope. Il s'agit de cas très rares car seuls quelques composés cristallisent sous des formes ainsi isolables.

#### 1.1.2.3.1. La cristallisation

##### - La cristallisation préférentielle ou sélective

Cette technique consiste à cristalliser sélectivement un des deux énantiomères. Une solution saturée en racémique estensemencée par un noyau cristallin optiquement actif et de même nature. L'autre énantiomère reste alors en solution. Il s'agit d'une méthode qui n'est applicable qu'avec certains racémiques appelés conglo-mérats. Ils ont la particularité de former des cristaux non identiques ne renfermant qu'un seul des énantiomères. Seulement 20 % des racémiques possèdent cette propriété. Cette technique nécessite généralement un contrôle minutieux de la température et l'utilisation de noyaux cristallins extrêmement purs (Wood, 1997).

##### - La cristallisation de sels de diastéréoisomères

C'est une méthode très utilisée. Elle a été proposée par L. Pasteur en 1852 et est toujours d'actualité. La méthode comprend une réaction chimique en présence d'un acide (ou d'une

base) optiquement actif appelé agent résolvant qui conduit à la formation d'un mélange de sels de diastéréoisomères qui sont ensuite séparés par simple cristallisation.

#### 1.1.2.3.2. La chromatographie

La séparation par chromatographie chirale est basée sur la différence d'interaction des deux énantiomères avec un adsorbant homochiral. La liaison non covalente entre l'adsorbant et les énantiomères forme des complexes de diastéréoisomères qui ont des énergies de liaisons différentes. L'équilibre entre l'état lié et l'état libre est de ce fait distinct pour chacun des énantiomères. Il en résulte une vitesse de migration propre à chacun des énantiomères qui permet une séparation chromatographique. Bien que le principe soit connu et compris depuis un certain temps, ce n'est qu'en 1983-1986 que les progrès techniques de chromatographie et de préparation d'adsorbants optiquement purs ont permis la réalisation pratique de telles séparations. Le prix élevé de la phase stationnaire reste cependant la principale limitation de cette méthode. La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sur colonne chirale est utilisée industriellement pour la séparation de mélanges racémiques et sera la méthode analytique utilisée dans notre étude.

#### 1.1.2.3.3. La séparation membranaire

Il existe deux types de procédés membranaires pour la séparation d'énantiomères : la séparation directe utilisant une membrane énantiosélective, ou la séparation indirecte dans laquelle une membrane non sélective assiste un procédé énantiosélectif (Keurentjes and Voermans, 1997). Le procédé énantiosélectif peut être enzymatique et également être couplé à une racémisation, ces deux notions seront discutées dans les paragraphes suivants (Yon et al., 2013).

#### 1.1.2.3.4. La résolution cinétique

##### - La voie chimique

Cette technique repose sur la différence de vitesse de réaction de chaque énantiomère avec un réactif chimique optiquement pur. Les énergies des états de transition de chaque énantiomère sont différentes, impliquant une différence de vitesse. Ainsi la modification des propriétés physiques de l'un des deux énantiomères permettra par la suite d'assurer la

résolution du racémique par des méthodes classiques de séparation utilisées en chimie organique.

### - La voie biologique

Parfois appelée synthèse par bioconversion, ou biocatalyse, la synthèse de composés énantiomériquement purs par voie biologique fait appel à des enzymes isolées (biocatalyseur) ou à des microorganismes entiers selon les cas. C'est la voie enzymatique qui sera envisagée dans ce travail pour effectuer la résolution d'un mélange racémique.

Les enzymes sont des protéines, constituées d'un enchainement d'acides aminés qui adoptent par repliement une structure très bien définie dans l'espace. Dans cette structure tridimensionnelle, il existe des « cavités réactionnelles » où la réaction se produit : les sites actifs. Ces derniers donnent à l'enzyme des propriétés catalytique et sélectives remarquables qui font que l'enzyme peut réagir préférentiellement avec l'un des énantiomères. L'image clef/serrure représente bien ce système, l'enzyme peut être assimilée à une serrure et les énantiomères à des clefs très proches l'une de l'autre. Dans le meilleur des cas, seule l'une des clefs est capable d'ouvrir la « porte », c'est-à-dire être transformée en un produit de réaction. Cependant la résolution enzymatique est souvent dite « cinétique », c'est-à-dire les deux énantiomères peuvent réagir mais l'un des énantiomères sera transformé nettement plus rapidement que l'autre.

Il est intéressant d'utiliser les propriétés naturelles des enzymes du point de vue de la sélectivité (régio, stéréo et substrat spécificité) et de les améliorer si besoin (par biologie moléculaire, en jouant sur les conditions de réaction...). Dans ce travail, ce sera la résolution cinétique par voie enzymatique qui sera mise en œuvre pour séparer les énantiomères de substrats d'intérêt (ces substrats seront présentés dans le paragraphe 1.4).

L'énantiosélectivité et le rendement peuvent varier en fonction des paramètres physico-chimiques du procédé, une étude de l'effet de ces paramètres sur l'énantiosélectivité et l'activité est nécessaire pour optimiser un procédé (Celebi et al., 2007; Ceynowa and Rauchfleisz, 2003; Matsuda et al., 2004; Palocci et al., 2008; Rantakyla and Aaltonen, 1994; Rezaei et al., 2007; Salgin et al., 2007). De plus lors du procédé d'immobilisation (cf paragraphe 1.2.4) l'énantiosélectivité peut être modifiée (Casas-Godoy et al., 2013; Torres et

al., 2006b). Enfin l'énantiosélectivité d'une enzyme peut être améliorée par biologie moléculaire, ce sera la méthode envisagée dans ce travail dans le Chapitre II pour les substrats d'intérêt.

La racémisation est une méthode utilisée pour améliorer le rendement de réaction lorsque la méthode utilisée est une résolution cinétique. La résolution cinétique utilise un substrat de départ racémique (50 % de chaque énantiomère), seul 50 % de ce substrat est catalysé par l'enzyme pour former le produit souhaité dans le cas où l'enzyme est fortement énantiosélective. De ce fait le rendement ne peut excéder 50 %. On peut réutiliser le substrat énantiomériquement pur non converti en le retransformant en mélange racémique qui servira à nouveau de substrat de départ. Si la racémisation s'effectue *in situ* et relativement rapidement le rendement peut alors être largement augmenté. Dans le cas où la racémisation s'effectue *in situ* on parle de DKR (Dynamic Kinetic Resolution). Il faut alors une compatibilité entre le catalyseur de la réaction souhaitée et le catalyseur effectuant la racémisation.

Pour que la DKR soit efficace il faut que :

- la réaction de départ, KR, Kinetic Resolution, soit sélective (forte sélectivité de l'enzyme)
- la racémisation rapide (au moins 10 fois plus rapide que la catalyse enzymatique de l'énantiomère réagissant le plus vite)
- le catalyseur de l'étape de racémisation ne doit pas réagir avec le produit de la KR
- la KR et la racémisation doivent pouvoir s'effectuer dans les mêmes conditions opératoires sans interférer.

Comme il a été évoqué précédemment les enzymes sont parfois naturellement énantiosélectives mais leur énantiosélectivité peut être améliorée, le calcul de l'énantiosélectivité est détaillé dans le paragraphe suivant.

### **1.1.3. Calcul de l'énantiosélectivité**

L'énantiosélectivité peut être évaluée de différentes manières (Équations 1). Pour une application pharmaceutique, l'énantiosélectivité doit être supérieure à 200 pour une séparation efficace des deux énantiomères ce qui signifie que l'un des énantiomères réagit

200 fois plus vite que l'autre ( $E \geq 200$ ). Ce sera l'objectif du Chapitre II de trouver des enzymes avec une énantiosélectivité supérieure à 200 pour les substrats d'intérêt.

Équations 1 : Calcul de l'excès énantiomérique, le taux de conversion et l'énantiosélectivité

A et B : énantiomères du substrat (B : énantiomère en plus grande quantité)

M et L : énantiomères du produit (M : énantiomère en plus grande quantité)

$ee_s$  et  $ee_p$  : excès énantiomérique du substrat et du produit respectivement

$vi_S$  et  $vi_R$  correspondent aux vitesses initiales de consommation des énantiomères S et R respectivement

---

<b>Excès énantiomérique : ee</b>	$ees = \frac{[B] - [A]}{[A] + [B]}$	$eep = \frac{[M] - [L]}{[M] + [L]}$
----------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------

---

<b>Taux de conversion : c</b>	$c = \frac{ees}{ees + eep}$
-------------------------------	-----------------------------

---

<b>Coefficient d'énantiosélectivité : E</b>	$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ees)]}{\ln[(1 - c)(1 + ees)]} = \frac{\ln[1 - c(1 + eep)]}{\ln[1 - c(1 - eep)]}$
---	---

Pour une énantiosélectivité S :  $E = \frac{vi_S}{vi_R} = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_S}{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_R}$

Pour une énantiosélectivité R :  $E = \frac{vi_R}{vi_S} = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_R}{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_S}$

---

Dans le cadre de cette étude le calcul de l'énantiosélectivité sera effectué à partir du quotient des vitesses initiales de conversion des deux énantiomères. Les excès énantiomériques,  $ee_s$  et  $ee_p$ , permettent de quantifier dans un milieu réactionnel la quantité de l'énantiomère dominant qui dépasse la quantité du second énantiomère. Plus l'excès énantiomérique est proche de 1 et plus le composé est sous forme d'un seul et unique énantiomère.

#### 1.1.4. Hydrolyse / estérification

Deux réactions sont envisagées : l'estérification d'un acide et sa réaction inverse, l'hydrolyse de l'ester. Ces réactions ayant pour objectif de faire la séparation des énantiomères des substrats d'intérêt, il est possible de réaliser indifféremment une hydrolyse ou une estérification énantiosélective (ou une autre réaction) pour effectuer la résolution du racémique. Notons que, dans un contexte plus large de synthèse organique par voie enzymatique, ce degré de liberté n'existe pas. Ces deux réactions envisagées sont présentées dans la Figure 6. De plus, il est intéressant de noter que l'eau est un substrat de la réaction d'hydrolyse et de ce fait nécessaire pour effectuer la réaction dans ce sens.

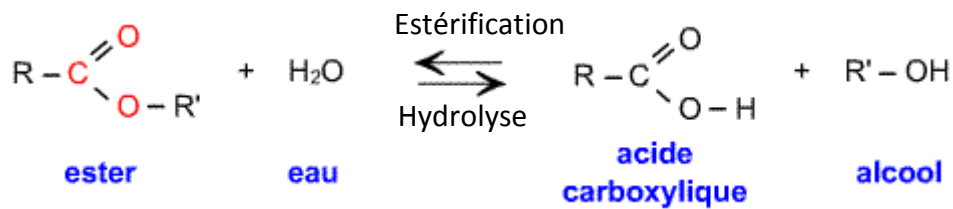


Figure 6 : Réaction d'hydrolyse d'un ester et réaction inverse l'estérification d'un acide

Pour effectuer ces réactions de manière énantiosélective le biocatalyseur envisagé est une enzyme et plus précisément une lipase, cette enzyme est décrite dans le prochain paragraphe.

## 1.2. Enzymes : les lipases

Les enzymes sont classées : « Enzyme Commission number » (EC) par rapport à leurs activités enzymatiques :

Oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases.

### 1.2.1. Généralités sur les lipases

Les lipases (Triacylglycérol-acylhydrolases (EC3.1.1.3)) font partie des hydrolases (EC. 3) et leur fonction biologique est d'hydrolyser les triglycérides. Les lipases ont été mises en évidence, dès 1901, chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens* (maintenant dénommées respectivement *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*) (Eijkmann, 1901). De nombreuses lipases immobilisées ou non, sont disponibles dans le commerce, elles peuvent provenir d'animaux (dans les tissus pancréatiques et prégastriques des ruminants), de microorganismes (*Penicillium* spp., *Geotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizomucor* spp., *Candida* spp., *Pseudomonas* spp.) ou de plantes (par exemple *Caricaceae* ou *Euphorbiaceae*).

La production, purification, caractérisation et applications des lipases sont décrites par Sharma et al. en 2001. Parmi les différentes applications citées, c'est l'aspect sélectivité des lipases qui va particulièrement être étudié pour ce travail. En effet les lipases présentent des sélectivités intéressantes vis-à-vis des différents substrats telles qu'une régiosélectivité (Palocci et al., 2008) ou une énantiosélectivité (Chang and Tsai, 1997; Liu et al., 2013;



Matsuda, 2013; Overbeeke and Jongejan, 2003; Paiva et al., 2011; Palocci et al., 2008; Salgin et al., 2007).

#### 1.2.1.1. Les substrats et réactions catalysés

Les lipases peuvent catalyser différentes réactions : acétylations, amidations, synthèses de polymères (Matsuda, 2013), transestérifications, hydrolyses ou encore estérifications, ce sont ces deux dernières réactions qui nous intéresseront particulièrement lors de cette étude. Les substrats naturels des lipases sont les triacylglycerols avec de longues chaînes d'acide gras.

Les lipases catalysent préférentiellement l'hydrolyse d'esters à longue chaîne carbonée ( $C > 10$ , l'acide oléique  $C_{18} : 1$  étant la référence) insolubles dans l'eau. Cette préférence les différencie des estérases qui agissent sur les esters à courte chaîne carbonée ( $C < 10$ , la tributyrine  $C_4$  étant la référence) solubles dans l'eau. Cependant, les lipases sont aussi capables d'hydrolyser les substrats solubles des estérases (la réciproque est fautive), mais souvent de manière moins efficace. Les substrats à longue chaîne carbonée des lipases sont donc le plus souvent insolubles, ce qui fait des lipases des enzymes particulières, capables d'agir en milieu diphasique, à l'interface entre les substrats hydrophobes et le milieu aqueux (Reis et al., 2010).

#### 1.2.1.2. Repliement $\alpha/\beta$

Le repliement  $\alpha/\beta$  est un motif qui est commun à de nombreuses enzymes hydrolytiques (protéases à sérines et à cystéines, subtilisine, et les hydrolases à repliement  $\alpha/\beta$ ). Il est composé d'un feuillet  $\beta$  à 8 brins, entouré de 6 hélices  $\alpha$ , cf Figure 7. Les enzymes possédant ce type de repliement ont toutes une triade catalytique de type : nucléophile – histidine – acide, ces résidus catalytiques étant les éléments structuraux les mieux conservés (Ollis et al., 1992). Le repliement  $\alpha/\beta$  commun à toutes les lipases est composé au minimum de 5 brins  $\beta$  parallèles dans le feuillet  $\beta$  central et deux hélices  $\alpha$  (B et C) (Schrag and Cygler, 1997) mais au sein des différentes familles de lipases il y a des variations structurales, cf Figure 8.

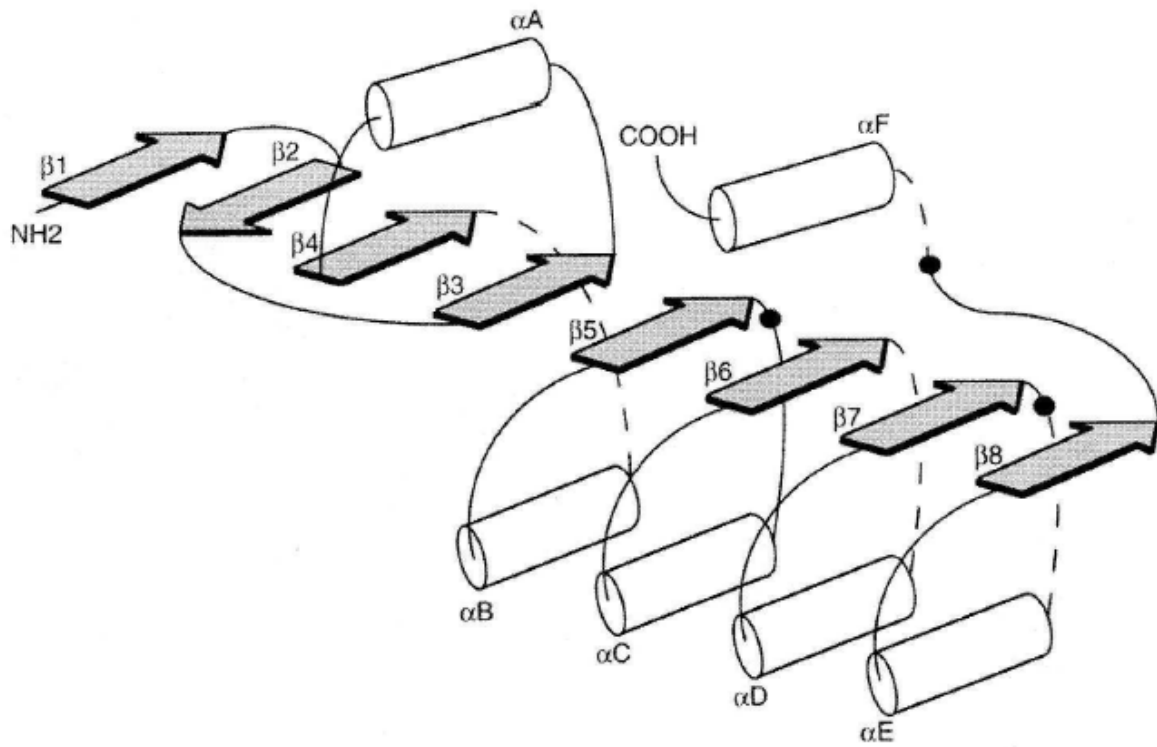


Figure 7 : Image simplifiée du repliement 3D des hydrolases d'après le schéma de Jaeger et al., 1999  
 Les hélices  $\alpha$  sont représentées par des cylindres, les brins  $\beta$  sont indiqués par des flèches grisées. La position des résidus du site actif est représentée par un point noir, la serine catalytique est positionnée après le brin 5, le résidu Asp/Glu après le brin 7, et l'histidine est dans la boucle entre le brin 8 et l'hélice  $\alpha F$

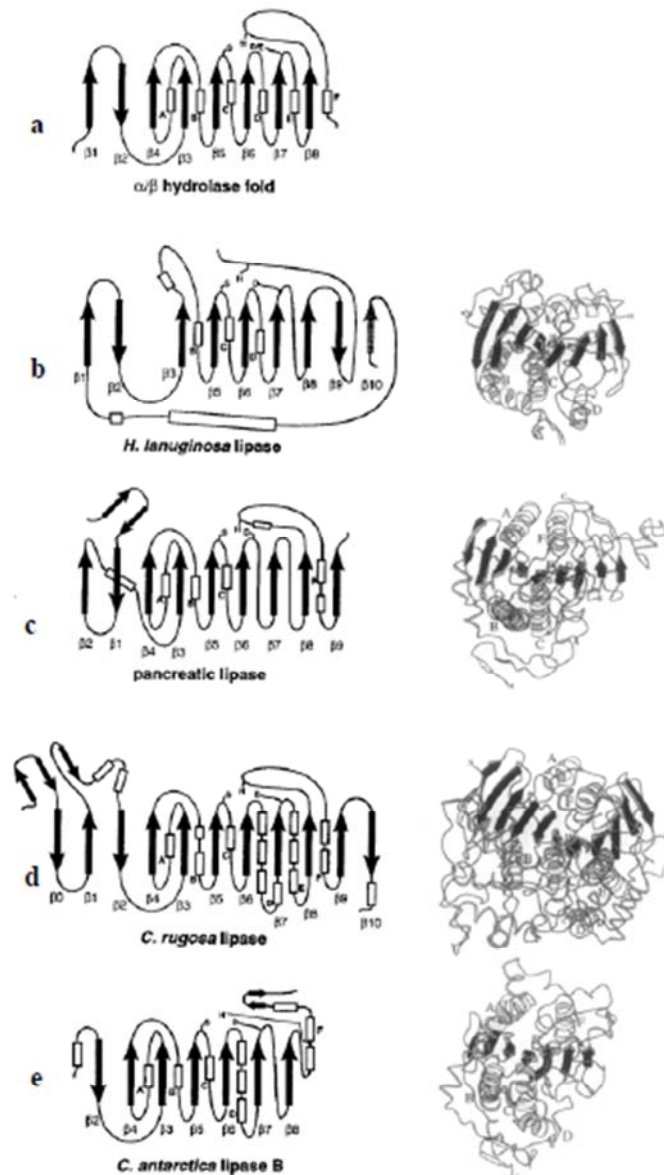


Figure 8 : Schéma du repliement  $\alpha/\beta$  de quatre lipases représentatives de quatre familles de lipases D'après Schrag et Cygler (1997), la numérotation des hélices et brins  $\beta$  est conforme à celle de Ollis et al. (1992). Sur la gauche, représentation schématique du repliement. A droite, une représentation de la structure tridimensionnelle. Seuls les brins  $\beta$  appartenant au repliement  $\alpha/\beta$  classique sont représentés sur le schéma. Une lettre jouxte les hélices  $\alpha$  appartenant au repliement  $\alpha/\beta$  classique. On notera que le brin  $\beta$  10 présent chez la lipase de *Thermomyces lanuginosa*, n'est pas présent dans toutes les lipases de cette famille (lipases de *R. miehei* par exemple)

La structure des lipases de type *R. miehei* (*R. delemar* et *H. lanuginosa*, *P. camembertii*) présente des différences par rapport au repliement  $\alpha/\beta$  des autres lipases (Schrag and Cygler, 1997) :

- Le feuillet  $\beta$  est composé de 9 brins et le brin  $\beta_4$  n'est pas présent chez ce type de lipases (si on se réfère à la nomenclature du repliement  $\alpha/\beta$  proposé par Ollis).

- Les hélices B, C et D sont conservées mais les hélices A, E et F sont absentes. Normalement, les hélices A et F sont situées sur la même face du feuillet. Ces hélices sont, semble-t-il, remplacées par une longue hélice placée de ce même côté du feuillet avec l'axe de l'hélice presque perpendiculaire au feuillet.
- L'histidine catalytique n'est pas placée directement après le brin  $\beta 8$  mais après un brin  $\beta 9$  antiparallèle.

#### 1.2.1.3. La triade catalytique

Les lipases possèdent une triade catalytique mise en évidence lorsque la première structure de lipase a été résolue en 1990 (Brady et al., 1990). La triade catalytique est un élément très conservé dans la structure des lipases. Elle est classiquement formée d'une sérine, d'un acide aspartique (ou plus rarement, par exemple chez *Géotrichum candidum* et *Candida rugosa* d'un acide glutamique) et d'une histidine (Buchholz and Kasche, 2006). La sérine catalytique est située dans un élément structural appelé coude nucléophile (un  $\gamma$  like turn) et se trouve dans une séquence du type Gly-X-Ser-X-Gly (Ollis et al., 1992). Cette structure permet à la sérine d'être d'une part proche de l'histidine catalytique, et d'autre part positionnée de façon optimale pour l'attaque nucléophile du substrat. Il faut noter cependant qu'une autre famille de lipases a été mise en évidence : la famille « GDSL », dans cette famille la sérine catalytique est placée dans une séquence consensus GDSL (Akoh et al., 2004) (c'est par exemple le cas des lipases d'*Aeromonas hydrophilia*, *Xenorhabdus luminescens* et *Streptomyces rimosus*).

Les éléments structuraux communs à toutes les lipases sont :

- une triade catalytique Ser-Asp/Glu-His (linéaire dans la séquence).
- la sérine catalytique est positionnée dans un coude nucléophile après le brin  $\beta 5$ .
- au moins 5 brins  $\beta$  parallèles dans le feuillet  $\beta$  central.

#### 1.2.1.4. Le phénomène d'activation interfaciale

Le phénomène d'activation interfaciale est une des caractéristiques très souvent observée pour les lipases. Il a été identifié pour la première fois en 1936 (Holwerda et al., 1936) puis

en 1945 (Schonheyder and Volqvartz, 1945) : l'activité des lipases augmente significativement quand celles-ci agissent à une interface, c'est-à-dire sur un substrat insoluble (émulsion) plutôt que sur le même substrat en dessous de sa limite de solubilité. En 1958, Sarda et Desnuelles (Sarda and Desnuelle, 1958) ont défini la lipase sur la base de ce phénomène d'activation interfaciale. En effet, les estérases ne présentent pas cette particularité. La Figure 9 illustre la présence d'activation interfaciale chez la lipase et son absence chez les estérases, lorsque le substrat devient insoluble la lipase devient subitement plus active.

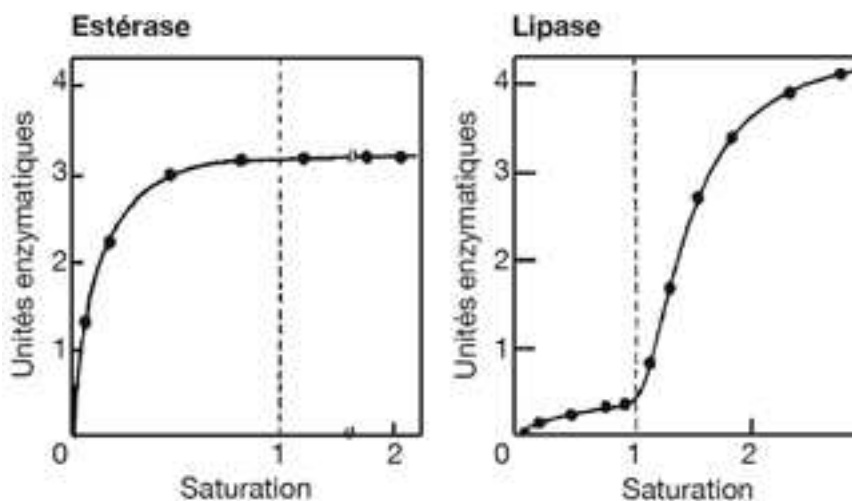


Figure 9 : Comparaison entre une estérase et une lipase (Sarda and Desnuelle, 1958)

#### 1.2.1.5. Le volet moléculaire

Le phénomène d'activation interfaciale peut être mis en relation avec la présence d'un volet, volet moléculaire amphiphile (« lid » en anglais), que certains appellent parfois de manière imagée paupière, qui donne les bases structurales pour l'explication de ce phénomène d'activation interfaciale. En 1990, lorsque les premières structures de lipases ont été élucidées (Brady et al., 1990; Winkler et al., 1990), il a été observé qu'un volet moléculaire couvre le site actif. Il est alors supposé que le contact avec le substrat hydrophobe permet un changement de conformation qui va permettre à ce volet de découvrir le site actif et le rendre accessible au substrat. Le mouvement du volet moléculaire est clairement mis en évidence lorsque les lipases sont cristallisées en présence d'inhibiteurs mimant les substrats à l'intérieur du site actif (Brzozowski et al., 1991; Derewenda et al., 1992). On distingue donc deux isomères conformationnels des lipases : une forme ouverte, active et une forme

fermée, inactive. Le mouvement du volet ne fait pas qu'ouvrir le site actif, il contrôle également l'accessibilité du site actif par le substrat et s'accompagne aussi d'une augmentation de la surface hydrophobe et d'une diminution de la surface hydrophile autour du site actif de l'enzyme, ce qui permet d'attirer le substrat hydrophobe. La Figure 10 montre schématiquement les deux conformations possibles.

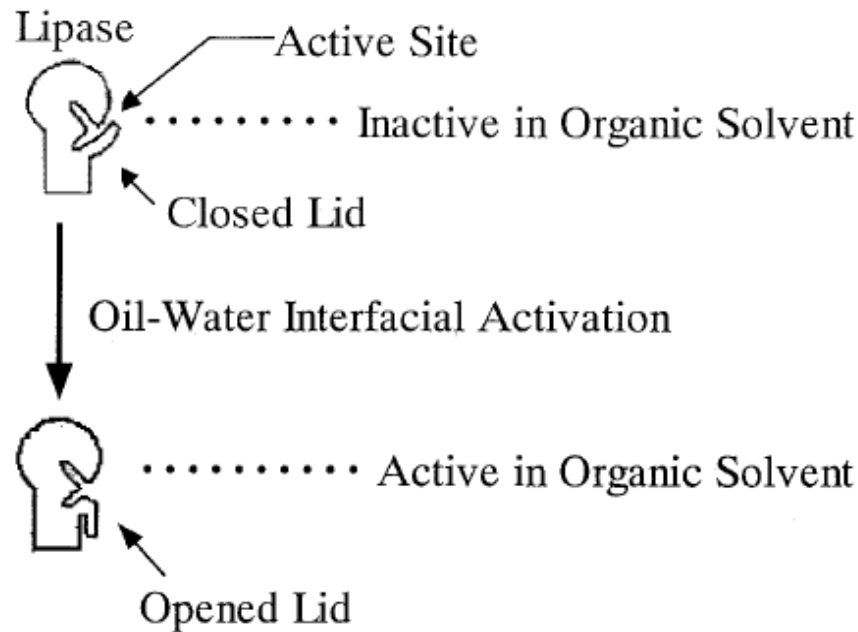


Figure 10 : Formes des lipases, active et inactive, dues à la présence du volet moléculaire (Maruyama et al., 2000)

Lorsque les substrats sont sous forme solubilisée dans l'eau, le volet moléculaire est refermé, le site actif peu accessible et donc l'enzyme est peu active. Lorsqu'une interface est présente, le volet moléculaire est ouvert, laissant le site actif accessible provoquant une augmentation brutale de l'activité de l'enzyme. La position du volet évolue suivant l'environnement de la protéine (pH, concentration du tampon, solvant) permettant un contrôle de l'accès du site actif (Maruyama et al., 2000). La lipase Lip2p de *Y. lipolytica* possède un volet moléculaire, les mécanismes moléculaires impliqués dans les mouvements de ce volet ont été étudiés (Bordes et al., 2010) (la lipase Lip2p de *Y. lipolytica* fera l'objet de paragraphe 1.2.3 car ce sera une des lipases d'intérêt pour ce travail). Toutes les lipases ne présentent pas de volet moléculaire ou d'activation interfaciale, parfois les deux, parfois seulement un des deux ou aucun, tous les cas sont possibles. Par exemple la lipase B de *Candida antarctica* ne possède pas de volet et ne présente pas d'activation interfaciale (Martinelle et al., 1995). La présence d'un volet n'est pas nécessairement corrélée avec le

phénomène d'activation interfaciale. En effet, malgré la présence d'un volet moléculaire recouvrant leur site actif, certaines lipases : les lipases de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* (K. E. Jaeger et al., 1999), et une lipase pancréatique de ragondin et de cobaye (présence d'un petit volet) (Thirstrup et al., 1994) ne montrent pas d'activation interfaciale. D'autre part, la phospholipase pancréatique A2 ne possède pas de volet (Van den Berg et al., 1995) mais présente un haut degré d'activation interfaciale avec la diheptanoylphosphatidyl-choline comme substrat (Pieterse et al., 1974). L'activation interfaciale n'est donc pas présente chez toutes les lipases (Martinelle et al., 1995; Thirstrup et al., 1994) et ce phénomène est substrat-dépendant. Cela remet en cause la définition des lipases en terme cinétique introduite par Sarda et Desnuelles (1958). Une lipase ne peut donc se définir que par les substrats qu'elle est capable d'hydrolyser : les triglycérides et esters à longues chaînes (Ferrato et al., 1997).

#### 1.2.1.6. Le trou oxyanion

Au cours de la réaction catalytique un intermédiaire tétraédrique est formé (cf paragraphe 1.2.1.7 sur le mécanisme d'action), celui-ci est stabilisé par au moins deux liaisons hydrogène formées avec les groupes amides de la chaîne carbonée. Les deux acides aminés participant à la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique forment le trou oxyanion.

Le premier résidu du trou oxyanion est situé dans la région N terminale des lipases, c'est un élément bien conservé au sein des différentes familles de lipases. Il est situé dans une boucle entre le brin  $\beta 3$  et l'hélice  $\alpha A$ . Pleiss et al., 2000 ont identifié deux types de trou oxyanion GX et GGGX (représentés en Figure 11). Il existe une troisième classe, la classe Y, cette tyrosine est très préservée dans ce groupe (Fischer et al., 2006). Le type de trou oxyanion semble être corrélé avec la spécificité de substrats des lipases. En effet les lipases de type GX auront une spécificité marquée pour les substrats à longues chaînes carbonées, alors que les lipases possédant un trou oxyanion de type GGGX seront spécifiques des courtes chaînes carbonées. Les lipases de types fongiques ont un trou oxyanion de type GX (X étant une sérine ou une thréonine), l'intermédiaire tétraédrique est peut être stabilisé par la chaîne latérale participant à une troisième liaison hydrogène.

Le deuxième résidu du trou oxyanion est le résidu X2 de la séquence consensus G-X1-S-X2-G, où se trouve la sérine catalytique. Pour les lipases de type *R. miehei*, la séquence consensus

est GHSLG, le deuxième résidu du trou oxyanion est donc une leucine. Elle est positionnée dans le coude nucléophile et sa position est très conservée chez les lipases.

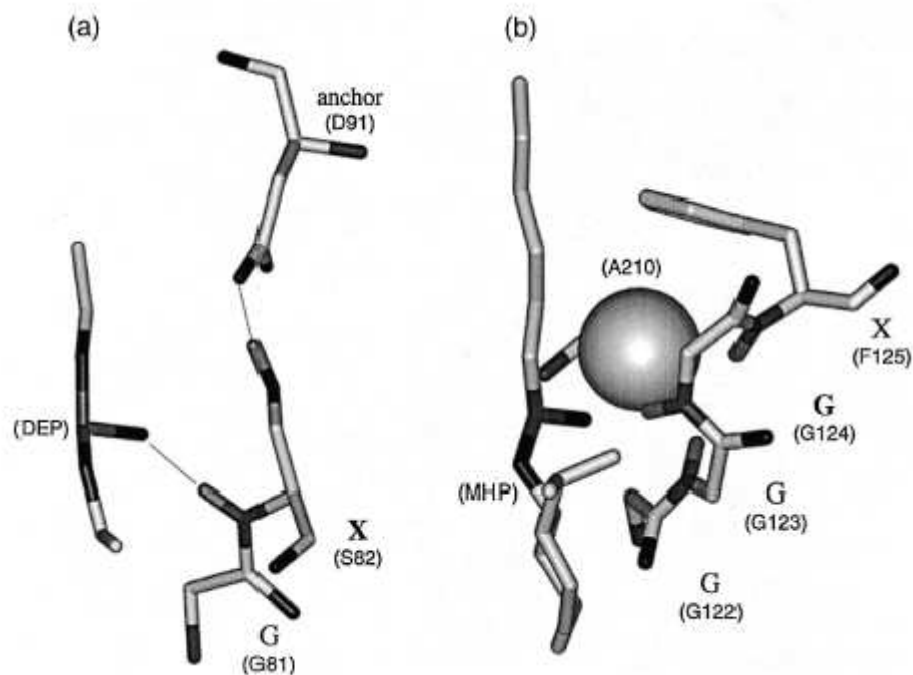


Figure 11 : Illustration des deux types de trous oxyanions retrouvés chez les lipases

(a) Type GX dans la lipase de *R. miehei* : stabilisation d'un analogue de substrat (diéthylphosphonate) par une liaison hydrogène avec le X du premier résidu du trou oxyanion (S82), et stabilisation de ce résidu par le résidu « ancre » D91. (b) Type GGGX dans la lipase de *C. rugosa*. Stabilisation d'un analogue de substrat (1R-menthyl-hexyl phosphonate) par le G du premier résidu du trou oxyanion (G124), stabilisation par blocage de la chaîne latérale de l'autre résidu du trou oxyanion (A210) entre G et la chaîne latérale de X (F125)

#### 1.2.1.7. Le mécanisme d'action

Le mécanisme catalytique des lipases (Cygler et al., 1994) est semblable à celui observé chez les protéases à sérine. La Figure 12 décrit les différentes étapes du mécanisme d'action.

La première étape est une étape d'acylation. Le transfert de proton entre l'acide aspartique (ou acide glutamique), l'histidine et la sérine catalytique, entraîne l'attaque nucléophile de l'hydroxyle de la sérine sur le carbonyle du substrat. Un premier intermédiaire tétraédrique est alors créé, il porte une charge négative sur l'oxygène de l'ex-fonction carbonyle. L'intermédiaire tétraédrique est stabilisé par 5 liaisons hydrogène dont au moins deux entre l'oxygène chargé négativement (l'oxyanion) et les groupes amides NH du trou oxyanion de la chaîne principale. Par retour du doublet de l'oxygène et le transfert de proton de l'histidine, le premier produit de la réaction est libéré. Il s'agit d'une molécule d'eau dans le cas d'une



estérification, R' est dans ce cas un hydrogène, ou d'un alcool dans le cas d'une hydrolyse. Le complexe enzyme-substrat formé est appelé acyl-enzyme.

La deuxième étape est une étape de déacylation et fait intervenir une attaque nucléophile qui peut être exercée par une molécule d'eau (hydrolyse) ou par un alcool (estérification) sur le carbonyle de l'acyl-enzyme. Un deuxième intermédiaire tétraédrique est formé selon un processus analogue à celui de l'étape d'acylation et entraîne la formation du second produit de la réaction (acide carboxylique ou ester) avec bien entendu une régénération de l'enzyme native.

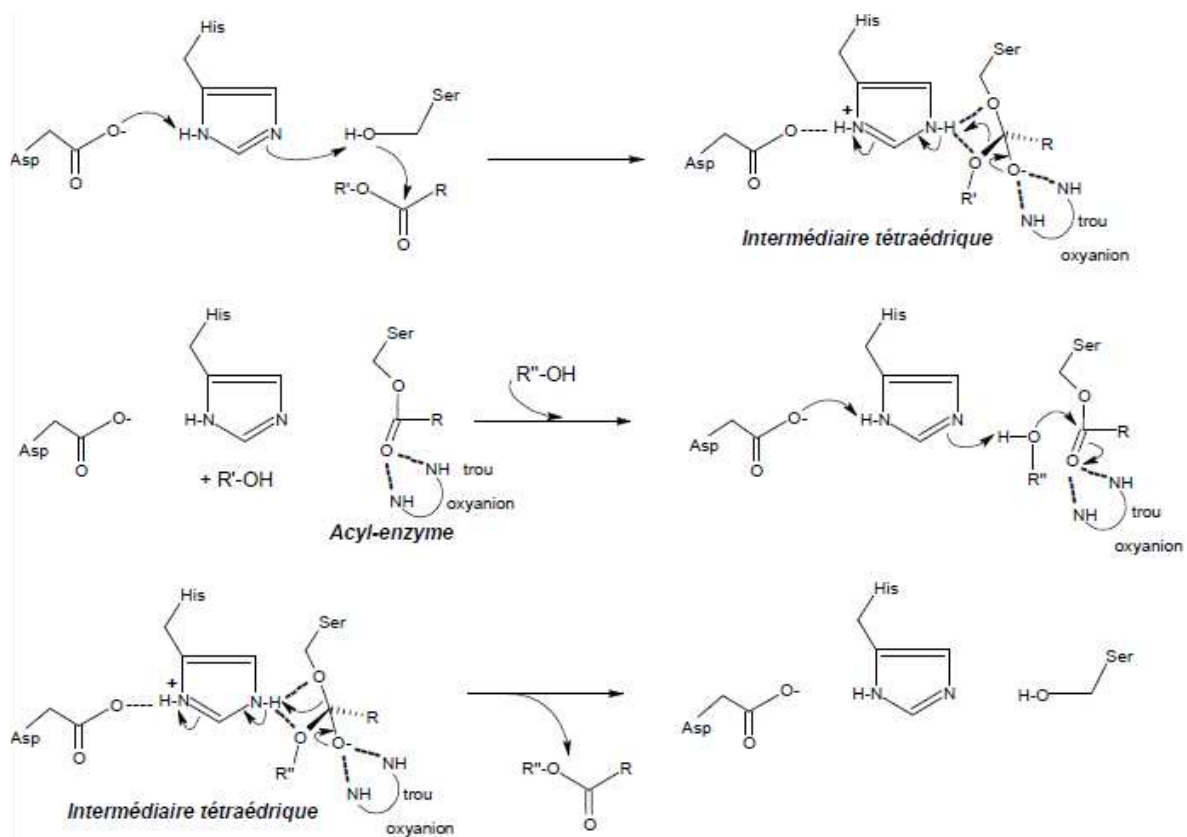


Figure 12 : Mécanisme d'action des lipases (Cygler et al., 1994)

Les paragraphes suivants s'intéressent aux levures qui produiront les lipases d'intérêt de toute cette étude, *C. rugosa* puis *Y. lipolytica*.

### 1.2.2. *Candida rugosa*

*Candida rugosa* (anciennement, *Candida cylindracea*) est une levure non pathogène, non sporulante, pseudo-filamenteuse unicellulaire. C'est l'un des organismes les plus étudiés par rapport à la sécrétion de ses lipases. En effet *C. rugosa* sécrète un mélange d'enzymes dont

au moins sept isoenzymes (Brocca et al., 1995). En 2010, Xu et al., ont séquencé le gène LipJ08 provenant de *C. rugosa* ATCC14830. Pour éviter les confusions les lipases de *C. rugosa* seront notées ici CRL et la notation Lip sera réservée aux lipases de *Y. lipolytica* bien que dans la littérature les lipases de *C. rugosa* sont bien souvent notées Lip1-7. Des mélanges de lipases de *C. rugosa* sont disponibles dans le commerce, la proportion d'isoenzyme peut varier en fonction de la source de carbone. Le Tableau 2 présente les proportions d'isoenzymes de *C. rugosa* en fonction du fournisseur commercial ou de la source de carbone utilisée comme inducteur. Les différentes isoformes de *C. rugosa* n'ont bien entendu pas les mêmes propriétés, c'est pourquoi malgré l'aspect pratique d'utiliser un mélange commercial il est intéressant d'étudier les lipases de *C. rugosa* sous forme d'isoenzyme pure. Les lipases CRL1, 3 et 4 ont été étudiées sous forme pure, après expression recombinante chez *Y. lipolytica*, pour la résolution d'un substrat d'intérêt, cette étude sera développée dans le paragraphe traitant des substrats d'intérêt dans le paragraphe 1.4.6 (Piamtongkam et al., 2011). De même l'utilisation de *Y. lipolytica* comme système d'expression sera développée dans le paragraphe 1.3.3.

**Tableau 2 : Proportion en isoenzymes dans les mélanges commerciaux et l'effet de la source de carbone comme inducteur (Domínguez De María et al., 2006)**

Inducer/origin sample	Isoenzymatic profile (%)			Reference/s
	Lip1	Lip2	Lip3	
Sigma (commercial)	73	8	19	Domínguez de María et al., 2005a
Sigma (commercial)	89	0	11	López et al., 2004
Roche (commercial)	66	13	21	Domínguez de María et al., 2005a
Amano (commercial)	74	0	26	López et al., 2004
Oleic acid (batch)	0	50	50	Sánchez et al., 1999b Ferrer et al., 2001
Oleic acid (batch)	0	60	40	Domínguez de María et al., 2005a
Olive oil (batch)	0	73	27	Domínguez de María et al., 2005a
Sunflower oil (batch)	0	73	27	Domínguez de María et al., 2005a
1-Dodecanol (batch)	22	34	44	Domínguez de María et al., 2005a
Glycerol (batch)	<5	<5	<5	Domínguez de María et al., 2005a
Oleic acid (fed-batch low feed rate)	0	50	50	Sánchez et al., 1999b López et al., 2004
Oleic acid (fed-batch high feed rate)	15	38	47	López et al., 2004

### 1.2.3. *Yarrowia lipolytica*

#### 1.2.3.1. Généralités

La levure *Y. lipolytica* (anciennement *Candida*, *Mycotorula*, *Endomycopsis* ou *Saccharomyces lipolytica*) est une levure non conventionnelle, non pathogène (Holzschu et al., 1979) qui a été approuvée dans plusieurs procédés industriels GRAS (Generally Recognized As Safe). Elle est retrouvée naturellement dans les produits riches en lipides tel que les fromages, les

produits laitiers, les huiles végétales ainsi que dans les eaux d'égouts (Zinjarde, 2014). *Y. lipolytica* est un ascomycète de la famille des *Saccharomycetaceae* (sous famille des *Saccharomycetoideae*). Elle a d'abord été classée comme *Candida lipolytica*, jusqu'à ce que la forme parfaite soit identifiée à la fin des années soixante par Wickerham. Elle a été reclassée comme *Endomycoopsis lipolytica* (Wickerham et al., 1970) puis comme *Saccharomycoopsis lipolytica*, (Yarrow, 1972) et finalement *Y. lipolytica* (van der Walt and von Arx, 1980). Depuis longtemps, la levure *Y. lipolytica* est étudiée pour son activité lipase extracellulaire (Peters and Nelson, 1948a, 1948b). La lipase de *Candida sp 99-125* et lipase Lip2p de *Y. lipolytica* ne font qu'une et même lipase car cette espèce appartient en fait au genre *Y. lipolytica*.

#### 1.2.3.2. Les lipases de *Yarrowia lipolytica*

*Y. lipolytica* possède 16 gènes codant pour des lipases, des lipases intracellulaires, membranaires et extracellulaires. La lipase que nous étudierons dans le prochain paragraphe fait partie des lipases extracellulaires, Lip2p. La sécrétion de lipases par *Y. lipolytica* a été reportée la première fois en 1948 par Peters et Nelson.

Parmi les 16 lipases de *Y. lipolytica*, Lip2p (334 acides aminés) a été fortement étudiée, Lip7p (366 acides aminés) et Lip8p (371 acides aminés) ont également été caractérisées comme des lipases extracellulaires de *Y. lipolytica*. De plus il semble que ce soit les trois seules lipases extracellulaires de cette levure, en effet un mutant dépourvu de ces trois enzymes ne sécrète plus de lipase. Au cours de cette étude, toutes les enzymes seront exprimées dans une souche de *Y. lipolytica* dépourvue de ces 3 gènes, voir paragraphe 1.3.3.

#### 1.2.3.3. Lip2p de *Yarrowia lipolytica*

Lip2p (PDB code : 3O0D, GenBank accession AJ012632) est une lipase extracellulaire sécrétée par la levure *Y. lipolytica*, c'est la lipase extracellulaire la plus sécrétée par cette levure, elle représente 95 % de l'activité extracellulaire. Son poids moléculaire est approximativement de 38 kDa (Yu et al., 2007), et elle est composée de 334 acides aminés (Pignède et al., 2000). Elle présente une forte homologie avec des lipases fongiques (par exemple les lipases de *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizopus niveus*, *Rhizomucor miehei*...)

(Cambon et al., 2010b; Yu et al., 2007). Lip2p a été utilisée en industrie pour le traitement des eaux par la compagnie Artechno.

La purification de cette protéine peut être effectuée par chromatographie à échange d'ions ou par de nombreuses autres méthodes (Brígida et al., 2014). La structure 3D de l'enzyme Lip2p est connue (Bordes et al., 2009), cette connaissance est très intéressante pour pouvoir utiliser certaines méthodes d'évolution génétique (cf paragraphe 1.3), de nombreux mutants existent et seront décrits dans les paragraphes 1.3.2 qui traite des mutations de Lip2p et 1.4 qui traite des substrats d'intérêt.

#### **1.2.4. Immobilisation**

Il est parfois intéressant d'utiliser l'enzyme sous forme immobilisée, l'immobilisation permet de récupérer et réutiliser facilement le biocatalyseur (par simple filtration par exemple). C'est également très utile si l'on envisage l'utilisation en solvant apolaire où l'utilisation d'une enzyme libre non dissoute en suspension entraîne généralement une agrégation de la poudre néfaste à l'efficacité catalytique. Les enzymes utilisées en CO<sub>2</sub> supercritique se présentent de manière générale sous forme immobilisée.

En outre l'immobilisation des enzymes permet généralement d'augmenter la stabilité (pH, température, pression, solvants...) et notamment la thermostabilité, rendant plus intéressante sa réutilisation. En effet, le coût de l'enzyme est en général élevé. Techniquement, l'immobilisation permet d'envisager un procédé en continu (type lit fixe) en général plus intéressant économiquement.

Pour améliorer les propriétés, notamment la thermostabilité de l'enzyme, il est possible de travailler sur le support (résine, polyuréthane, magnétique) d'immobilisation lui-même, la comparaison de plusieurs supports plus ou moins complexes pourra donner de bons résultats (Cui et al., 2013; Liu and Huang, 2010; Lozano et al., 2007; Marszałł and Siódmiak, 2012; Yan et al., 2013).

Différentes méthodes pour immobiliser des protéines peuvent être utilisées : inclusion, l'encapsulation (Blattner et al., 2006; Yilmaz et al., 2011b, 2010), adsorption (Liu et al., 2004; Torres et al., 2006a) ou création de liaisons covalentes (Yilmaz et al., 2011a) ou encore l'agrégation (Clea : cross-linked enzyme aggregates) (Weiser et al., 2014).

Des mélanges de lipases de *C. rugosa* sont disponibles dans le commerce sous forme lyophilisée, agrégée ou encore immobilisée sur différents types de supports.

Les méthodes utilisées spécifiquement pour la lipase Lip2p de *Y. lipolytica* ont été reportées (Caixia et al., 2016; Casas-Godoy et al., 2014; Cui et al., 2013; de Oliveira et al., 2006; Fickers et al., 2011; Yan et al., 2013) et décrites dans un article de revue (Brígida et al., 2014). Le choix du support pour l'immobilisation est souvent discuté (Liu and Huang, 2010; Lozano et al., 2007) et un choix de support bien adapté à une utilisation en CO<sub>2</sub>SC sera essentiel pour notre étude.

Les conditions opératoires (pH et température) lors de l'immobilisation peuvent jouer un rôle sur la conformation de l'enzyme une fois immobilisée (Torres et al., 2006b).

Les principales limites du procédé d'immobilisation sont la quantité d'enzyme effectivement immobilisée, l'orientation de la protéine et la modification de conformation de la protéine qui peuvent entraîner des pertes d'activité et/ou d'énantiosélectivité. C'est pourquoi il faut prendre en compte ces paramètres pour valider un procédé d'immobilisation.

L'orientation de la protéine lors de l'immobilisation peut être en partie maîtrisée par différentes méthodes. Notamment l'activation de l'interface et le bioimprinting peuvent permettre d'accroître les propriétés des enzymes dans le cadre d'une stratégie d'immobilisation. Ces stratégies ont pour but de favoriser la « conformation ouverte » ou « conformation active » de la protéine, pour rendre accessible le site actif de l'enzyme (Liu et al., 2013; Yan et al., 2013). Une autre méthode intéressante allie génie génétique et procédé d'immobilisation. Dans ce cas l'insertion d'une cystéine à un endroit précis de la protéine peut permettre par création de ponts disulfure avec le support d'orienter l'immobilisation de la protéine. Par génie génétique la cystéine sera donc ajoutée (ou remplacera un autre acide aminé) le plus loin possible du site actif (en prenant en compte le repliement de la protéine) et ne devra pas ou peu modifier la structure tertiaire de la protéine. Pour cela une connaissance du repliement de la protéine est primordiale et la création de plusieurs mutants ainsi qu'un screening seront nécessaires. Dans la littérature cette méthode novatrice a déjà montré des résultats très intéressants (Hernandez and Fernandez-Lafuente, 2011; Kim et al., 2008; Simons et al., 2013). De plus Godoy et al., 2013 ont utilisé cette méthode sur une lipase.

Le paragraphe suivant décrit les différentes méthodes d'évolution génétique ainsi que les mutations déjà effectuées sur Lip2p de *Y. lipolytica*. En effet pour améliorer l'énantiosélectivité de Lip2p vis-à-vis des substrats d'intérêt l'évolution génétique sera employée sur Lip2p.

### **1.3. Evolution génétique**

#### **1.3.1. Les méthodes d'évolution génétique**

Les enzymes sont intéressantes pour leur énantiosélectivité naturelle, mais aussi pour leurs activité et stabilité. Ces propriétés doivent parfois être améliorées et pour cela la biologie moléculaire peut être un outil remarquable. Trois méthodes peuvent être envisagées : ingénierie aléatoire (ou évolution dirigée), ingénierie rationnelle ou semi-rationnelle.

##### **1.3.1.1. L'évolution dirigée**

L'évolution dirigée permet de mimer en laboratoire l'évolution naturelle, darwinienne, des protéines par création aléatoire de diversité génétique. Cette étape est suivie d'un processus de sélection ou de criblage des mutants présentant l'amélioration recherchée. Il faut donc générer dans un premier temps une librairie de mutants. Cette librairie de mutants doit être de taille importante et la diversité génétique introduite doit être la plus grande et la moins biaisée possible. La deuxième étape consiste à sélectionner les mutants possédant la propriété désirée. L'évolution dirigée présente l'avantage de ne pas nécessiter d'information structurale pour sa mise en application. Cette approche est cependant peu utilisée pour l'amélioration de l'énantiosélectivité car les acides aminés éloignés du site actif ont en général peu d'influence sur l'énantiosélectivité et vont pourtant être potentiellement mutés avec cette méthode. De plus, il est difficile de générer toute la diversité possible (à cause des biais d'un grand nombre de techniques d'évolution dirigée) et également de développer des cribles rapides et efficaces pour espérer isoler dans de très larges banques les mutants ayant l'énantiosélectivité améliorée.

##### **1.3.1.2. La voie rationnelle**

L'ingénierie rationnelle consiste à modifier la structure d'une enzyme par changement du ou des acides aminés souhaités au moyen des techniques de mutagenèse dirigée. Les acides

aminés ciblés sont choisis en fonction des propriétés que l'on souhaite améliorer. Dans le cas de l'amélioration de l'énantiosélectivité, les positions mutées sont souvent proches du site actif et vont favoriser ou défavoriser le positionnement d'un des énantiomères au sein du site actif. Ces positions sont définies à partir de l'analyse structurale de la protéine, par des études de modélisation moléculaire telle que l'arrimage du substrat dans le site actif ou encore à l'aide de méthodes chimiométriques. Pour cela, il est important de connaître : la structure tridimensionnelle de l'enzyme, le mécanisme réactionnel, les résidus catalytiques, la conformation du site actif ou encore la spécificité de substrat. Les acides aminés ciblés sont souvent proches du site actif car il est difficile de prévoir l'effet de mutations distantes. Les mutants sont ensuite exprimés et les enzymes produites sont caractérisées pour déterminer l'amélioration apportée par la mutation. Différentes techniques de mutagenèse dirigée peuvent être employées comme la PCR (Polymerase Chain Reaction) par overlap extension, la PCR inverse, ou encore la PCR avec megaprimer.

### 1.3.1.3. La voie semi-rationnelle

Le terme ingénierie semi-rationnelle est utilisé pour décrire des méthodes permettant d'introduire toutes les mutations possibles sur un ou plusieurs codons choisis au préalable. L'approche consiste à créer des bibliothèques de mutants et éventuellement recombiner les meilleurs mutants dans une deuxième étape.

La modélisation moléculaire peut être d'une grande aide pour déterminer les acides aminés cruciaux pour la catalyse (et/ou l'énantiosélectivité) ou bien pour expliquer l'effet d'une mutation sur la structure en relation avec la fonction (Botta et al., 1997).

### 1.3.2. Les mutations de Lip2p

Lip2p a subi de très nombreuses mutations dans le but d'améliorer ses performances (sélectivité, stabilité, activité) et cela a permis d'identifier les segments d'acides aminés responsables de différentes caractéristiques. Un screening important de ces mutants a été effectué (Sandoval and Marty, 2007; Tan et al., 2003). Des exemples de mutations précises pour améliorer l'énantiosélectivité d'enzymes (et particulièrement de Lip2p) vis-à-vis des substrats d'intérêt seront détaillés directement dans les paragraphes dédiés aux substrats eux même (1.4).

La limitation pour une utilisation à l'échelle industrielle, est principalement liée à la faible thermostabilité (température maximum supportée : 40 °C). Cette limitation peut être atténuée par différentes méthodes : génie génétique, immobilisation, ajout d'agents stabilisants... Un mutant avec une thermostabilité supérieure a été créé par évolution dirigée, Lip2p C244A, ce qui a également permis de découvrir un acide aminé responsable de la dénaturation thermique (Bordes et al., 2011). Le monomutant Lip2p C244A et la souche sauvage possèdent des cinétiques et un mode d'agrégation (responsable de l'inactivation) différents, en effet alors que l'agrégation de l'enzyme sauvage est entraînée par la formation de ponts disulfure, ce sont des forces hydrophobes pour le monomutant (Bordes et al., 2011). Par la suite d'autres positions ont été identifiées comme étant impliquées dans la thermostabilité de Lip2p. Une combinaison de ces dernières (T117G, A103S, F237C) a permis de trouver d'autres mutants de Lip2p thermostables (Wen et al., 2012). Il aurait été intéressant de combiner les résultats obtenus par ces deux équipes.

### 1.3.3. *Y. lipolytica* comme système d'expression

Pour être utilisables industriellement les protéines naturellement produites par les organismes vivants doivent être souvent améliorées (stabilité, activité, sélectivité...) et également pouvoir être produites économiquement en grande quantité.

Dans ce but, différents systèmes d'expression peuvent être utilisés, des organismes qui vont produire l'enzyme souhaitée en grande quantité.

La souche peut être un procaryote, comme par exemple *Escherichia coli* (Long et al., 2007) qui est largement utilisée pour l'expression de protéines du fait de son faible coût, de sa disponibilité, de sa facilité d'utilisation et sa croissance rapide... Cependant ce genre de systèmes présente plusieurs désavantages tels que leur manque de modifications post-traductionnelles, le mauvais repliement de la protéine, une faible excrétion ou la formation de corps d'inclusion dans le cas d'une protéine intracellulaire (Elend et al., 2007).

C'est pourquoi il est souvent plus intéressant d'utiliser un système d'expression eucaryote. Parmi ceux-ci, les levures sont d'utilisation aisée, bon marché et possèdent une capacité à réaliser une maturation post-traductionnelle et de bonnes capacités de sécrétion. *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia Pastoris* sont les plus fréquemment utilisés. D'ailleurs Lip2p a déjà été exprimée chez *P. Pastoris* (Yu et al., 2007). Cependant *S. cerevisiae* procède à une hyperglycosylation et présente un faible taux de sécrétion. *P. pastoris* quant à elle



dispose d'un nombre variable de copies du gène ainsi qu'un faible taux de transformation (Boettner et al., 2002).

*Y. lipolytica* est une levure qui peut être utilisée comme souche d'expression d'une enzyme souhaitée (Bordes et al., 2007; Cambon et al., 2010b; Madzak et al., 2004; Nicaud et al., 2002). En effet *Y. lipolytica* possède un fort taux de sécrétion, des modifications post-traductionnelles, se cultive bien et elle procède à une glycosylation « raisonnable » (Nicaud et al., 2002). *Y. lipolytica* sera donc la souche d'expression que nous utiliserons.

Les souches dites d'expression sont des mutantes de souches existantes dans la nature. Ces souches ont été modifiées pour produire en grande quantité la protéine désirée, car cette protéine sera sous le contrôle d'un promoteur fort. De plus ces souches sont dépourvues de protéases qui pourraient détruire la protéine d'intérêt (Fickers et al., 2003; Nicaud et al., 2002; Pignède et al., 2000).

Il faut également choisir le promoteur (région de l'ADN indispensable pour la transcription du gène et donc de la synthèse de la protéine). Le promoteur POX est adapté pour la synthèse de protéines par *Y. lipolytica* (Fickers et al., 2005). C'est un promoteur inductible à l'acide oléique et ce sera le promoteur choisi pour la synthèse des lipases d'intérêt.

La souche JMY1212 de *Y. lipolytica* (Bordes et al., 2007) possède une plateforme d'intégration (zone zeta) qui permettra une intégration unique et ciblée du gène dans le génome de la souche. L'expression de l'enzyme est reproductible et permet une comparaison des mutants directement à partir du surnageant de culture (Cambon et al., 2010b). De plus, cette souche est délétée des principales protéases extracellulaires (XPR2) et des lipases (Lip2p, 7 and 8, rappelons que ce sont les trois seules lipases extracellulaire de *Y. lipolytica*) ce qui permet d'assurer une pureté des surnageant obtenus (Fickers et al., 2003; Nicaud et al., 2002; Pignède et al., 2000). C'est cette souche qui produira les mutants de Lip2p étudiés et c'est également cette souche qui produira les lipases isoformes de *C. rugosa* (CRL1, 4) qui seront étudiées lors de cette étude, les souches produisant ces isoformes étaient déjà disponibles au LISBP (Piamtongkam et al., 2011).

Les substrats d'intérêt appartiennent à la famille des acide 2-substitués qui est décrite ci-dessous.

## 1.4. Les acides 2-substitués

Les acides 2-substitués sont représentés principalement par les acides  $\alpha$ -arylpropioniques (ou les profènes) et les acides  $\alpha$ -aryloxypropioniques dans les domaines pharmaceutique et agrochimique. Les substrats d'intérêt sont présentés sur la Figure 13.

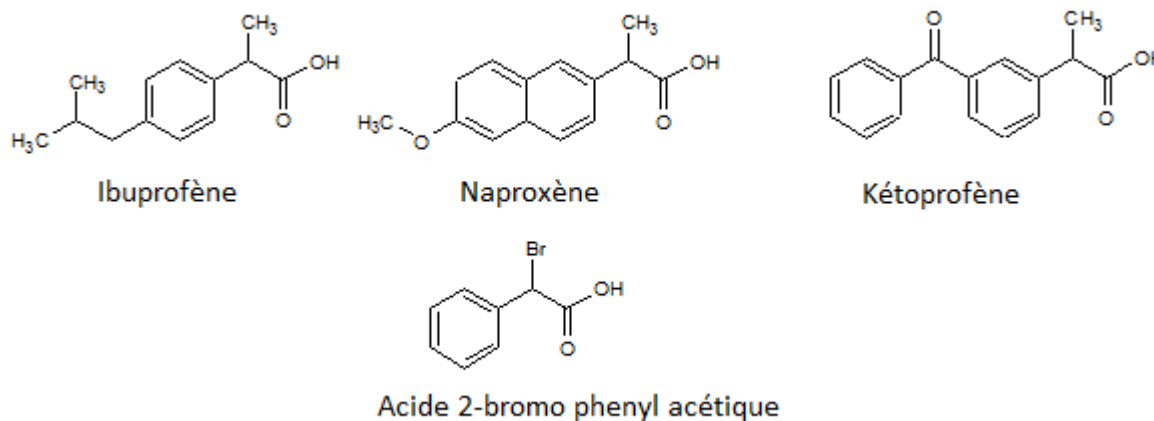


Figure 13 : Molécules d'intérêt

### 1.4.1. Généralités sur les profènes

Les profènes (acides 2-arylpropioniques) sont des molécules non stéroïdiennes ayant des propriétés anti-inflammatoires. Ces médicaments (comme l'ibuprofène, le kétoprofène, le naproxène) ont des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques, surtout dans le cas de l'énantiomère (*S*) bien qu'ils soient souvent commercialisés sous forme racémique.

L'étude porte sur trois profènes, le kétoprofène, le naproxène et l'ibuprofène.

### 1.4.2. L'ibuprofène

L'ibuprofène, (acide 2-(4-isobutylphényl) propionique) est communément utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et est parfois commercialisé sous forme de racémate (50 % de chaque énantiomère). Pourtant le (*S*) ibuprofène est 160 fois plus réactif que le (*R*) ibuprofène (pour la synthèse in vitro de prostaglandine et son effet analgésique) (Adams et al., 1976; Hutt and Caldwell, 1984). De plus le (*R*) ibuprofène présente une certaine toxicité dans les tissus adipeux, douleurs gastro-intestinales (Williams et al., 1986).

La méthode d'analyse par HPLC chirale d'ester d'ibuprofène a été mise au point (Ducret et al., 1998). C'est la méthode d'analyse qui sera utilisée dans cette étude pour l'ibuprofène mais également pour les trois autres substrats d'intérêt (le naproxène, le kétoprofène et l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique).

Différentes lipases ont été testées pour la résolution de l'ibuprofène : une lipase provenant de *Rhizomucor miehei* (Habibi et al., 2013; Mohammadi et al., 2016; Yousefi et al., 2014a), de *Candida antarctica* (Mohammadi et al., 2016; Yousefi et al., 2014a), de *Carica papaya* (Ng and Tsai, 2006), ou encore de *Penicillium expansum* (Lianghua et al., 2007). Egalement des mélanges commerciaux de lipases de *Candida rugosa* ont été utilisés pour effectuer la résolution de l'ibuprofène (Bhatia et al., 2004; Chang et al., 1998; Fazlena et al., 2006; Kim et al., 2000; Lee et al., 1995; Long et al., 2005; Manetti et al., 2000; Marszałł and Siódmiak, 2012; Siódmiak et al., 2013; Tsai and Wei, 1994; Won et al., 2006; Yousefi et al., 2014b). Le meilleur résultat en utilisant l'enzyme libre en terme d'énantiosélectivité ( $E=247$ ) a été obtenu grâce à l'addition de N,N-diméthylformamide qui est toxique (Lee et al., 1995). Les isoenzymes (CRL1, 2, 3) immobilisées ont été testées pour l'estérification de l'ibuprofène et l'étude a révélé que CRL1 possède la meilleure énantiosélectivité comparée aux autres isoenzymes ( $E>200$ ) (López et al., 2004).

### 1.4.3. Le naproxène

Contrairement aux autres profènes, le naproxène (acide (+) 2-(6-métoxy-2-naphthyl) propionique) est commercialisé sous forme d'un seul énantiomère (le *S*) (Williams et al., 1986). Le procédé Zambon (cf Figure 5) a d'ailleurs été présenté précédemment pour décrire la méthode d'obtention d'un énantiomère pur à partir d'une substance prochirale.

L'énantiomère *S* du naproxène possède une activité 28 fois supérieure au *R*) ((Battistel et al., 1991; Margolin, 1993).

*C. rugosa*, *C. papaya*, *C. pentagona* et *R. miehei*, ont été étudiées sous forme libre pour l'hydrolyse d'esters du naproxène (Botta et al., 1997; Chang et al., 1998; Chen et al., 2005; Ng and Tsai, 2006; Steenkamp and Brady, 2008, 2003; Wu and Liu, 2000; Xin et al., 2000). Les lipases provenant *C. rugosa* ont été les plus efficaces ( $E=356$ ) (Xin et al., 2005).

#### 1.4.4. Le kétoprofène

Seul l'énantiomère (*S*) du kétoprofène, le (*R, S*)-2-(3-benzoylphényl) propionique, possède la propriété anti inflammatoire, l'énantiomère (*R*) présente des effets secondaires gastro-intestinaux et une toxicité (Hutt and Caldwell, 1984), il peut être utilisé comme agent thérapeutique pour les maux de dents (Jin et al., 2003). Le kétoprofène est efficace dans les traitements de l'arthrite rhumatoïde, l'arthrite ostéoporose ou encore de la spondylarthrite ankylosante.

La résolution du kétoprofène a été effectuée avec une lipase provenant de *Trichosporon laibacchii* (Zhang and Liu, 2011), également avec une lipase de *Serratia marcescens* (Long et al., 2007), ou encore une lipase de *Candida rugosa* (Kim et al., 2000 ; Liu et al., 2004). Le meilleur résultat en terme d'énantiosélectivité a été obtenu avec une lipase provenant de *Acinetobacter* (E=751,8) (Lee et al., 2006).

Alors que la lipase de *C. antarctica* possède une faible énantiométrie (E=10) (Ong et al., 2006) des travaux font une belle démonstration de l'intérêt de la biologie moléculaire pour accroître l'énantiométrie d'une enzyme. En effet un quadruple mutant a été mis en évidence avec une énantiométrie fortement augmentée par rapport à l'enzyme native (E=405 pour le quadruple mutant alors que l'énantiométrie de l'enzyme sauvage est de 1,7) (Qin et al., 2013).

#### 1.4.5. Les autres profènes

Il y a bien entendu d'autres profènes qui ont été étudiés mais qui ne feront pas partie des substrats d'intérêt de cette étude. Par exemple le flurbiprofène (Bae et al., 2006; Ciou et al., 2011; Lee et al., 2003; Ng and Tsai, 2006; Qin et al., 2013), le fénoprofène (Ng and Tsai, 2006), le suprofène (Margolin, 1993; Tsai and Huang, 1999) ou encore l'atliprofen (Mittal et al., 2005).

Le quatrième et dernier substrat d'intérêt (avec l'ibuprofène, le naproxène et le kétoprofène) appartient à la famille des acides 2-halogéno-carboxyliques qui est décrite ci-dessous.

### 1.4.6. Les acides 2-halogéno-carboxyliques

Les molécules de type acide 2-halogéno carboxylique sont des intermédiaires intéressants d'un point de vue pharmaceutique car ils sont utilisés dans différentes voies pour obtenir des médicaments notamment des analgésiques comme la prostaglandine, la prostacycline, la pénicilline semi synthétique (Bouisset and Radisson, 1991)... En particulier le substrat d'intérêt est l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique, il appartient à la famille des esters de l'acide 2 halogéno aryl acétique.

De nombreux travaux ont été effectués sur des substrats de cette famille, notamment la transestérification énantiosélective. Cette réaction a été étudiée sur les dérivés du l'acide 2-bromo-tolylacétique en utilisant des lipases provenant de microorganisme différents, tels que *C. antarctica*, *R. miehei* ou encore *P. cepacia*, (Guieysse et al., 2003a, 2003b, 2001). La transestérification de quatre substrats de la famille des 2-bromo-aryl acetic acide esters (cf Figure 14) en utilisant des lipases provenant de *R. miehei*, *Burkholderia cepacia* et *Y. lipolytica*. La lipase de *Y. lipolytica* s'est montrée très intéressante du fait d'une vitesse initiale très élevée par rapport aux autres lipases (facteur 10) et d'une énantiosélectivité parfois inverse des autres lipases (Guieysse et al., 2004).

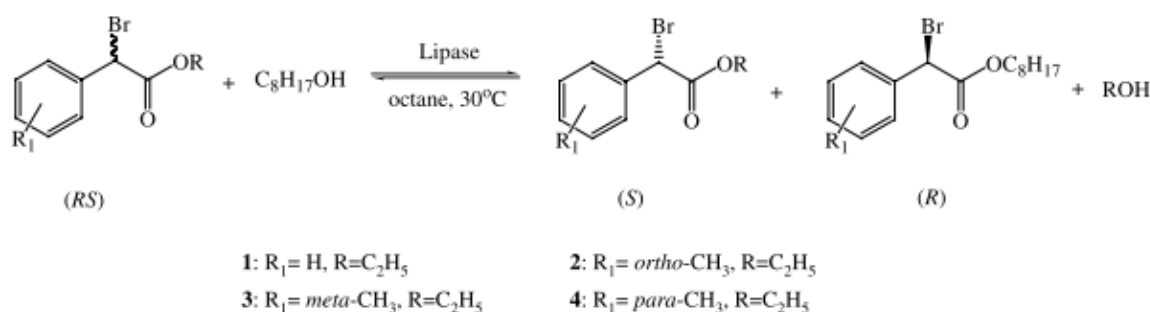


Figure 14 : Réaction de transestérification effectuée dans la publication de Guieysse et al., 2004

L'hydrolyse énantiosélective de l'acide 2-bromo phényl acétique octyl ester a été effectuée par une lipase provenant de *C. papaya*, cette lipase possède une forte énantiosélectivité ( $E > 200$ ), il s'agit de l'enzyme sauvage la plus énantiosélective décrite à ce jour (Rivera et al., 2013).

Les isoenzymes CRL1, CRL3, CRL4, de *C. rugosa* ont été étudiées pour la résolution l'acide 2-bromo phényl acétique octyl ester. CRL4 possède une préférence pour l'énantiomère (R) et possède une énantiosélectivité de 15, alors que CLR1 et CRL3 préfèrent l'énantiomère (S) et

possède une énantiosélectivité  $>200$ . Les auteurs sont allés plus loin que ce simple constat en comparant les séquences peptidiques des trois isoformes, la position 296 a été identifiée, elle contrôle l'énantio-préférence et également l'énantiosélectivité (Piamtongkam et al., 2011).

L'énantiosélectivité peut être augmentée (Bordes et al., 2009; Cancino et al., 2008) voire même inversée par évolution génétique (Cambon et al., 2010a). Grâce à ces travaux des acides aminés responsables de la discrimination des énantiomères, et donc de l'énantiosélectivité, ont été identifiés : les acides aminés 97 et 232 de l'enzyme Lip2p de *Y. lipolytica*. L'énantiosélectivité a été multipliée par 10 pour l'hydrolyse de l'ester éthylique de l'acide 2-bromo phényl acétique en utilisant le mutant Lip2p V232A (passage de  $E=5,5$  pour l'enzyme sauvage à 59) (Cancino et al., 2008). L'énantiosélectivité est encore accrue en remplaçant la valine en position 232 par une sérine, en effet, Lip2p V232S possède une énantiosélectivité infinie vis-à-vis de l'énantiomère (*S*) de l'ester éthylique de l'acide 2-bromo phényl acétique (Bordes et al., 2009). Un mutant doublement substitué sur les positions évoquées (97 et 232), Lip2p D97A-V232F possède une énantio-préférence inversée, une préférence pour l'énantiomère (*R*) et une énantiosélectivité infinie ( $E>200$ ) vis-à-vis de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique (Cambon et al., 2010a).

Après la recherche du meilleur catalyseur énantiosélectif pour les substrats d'intérêt, le second aspect de ce travail de thèse s'intéressera à la mise en œuvre de la réaction, en particulier en considérant de remplacer les solvants organiques conventionnellement utilisés par le  $\text{CO}_2$  supercritique. Ce sera l'objet des Chapitres III et IV. Les caractéristiques générales et les utilisations de ce solvant pour la catalyse enzymatique sont détaillées dans les paragraphes suivants.

## **1.5. Procédé en $\text{CO}_2$ supercritique**

### **1.5.1. Généralités sur les fluides supercritiques**

Un fluide supercritique est un fluide placé dans des conditions de pression et température telles que ce n'est ni un gaz ni un liquide (cf Figure 15). Lorsque la température augmente le liquide devient moins dense (expansion thermique), et lorsque la pression augmente le gaz devient plus dense. Au moment où les densités sont égales la distinction entre les phases

(liquide et gaz) disparaît, le point critique est atteint, il correspond au maximum de la courbe d'équilibre liquide-vapeur, au-delà de ce point, l'interface gaz/liquide disparaît, le fluide obtenu est monophasique et occupe tout l'espace disponible. Le point critique est découvert en 1822 par le baron Cagniard de la Tour. Dans ces conditions, le fluide est dit en état supercritique. On parle aussi de « gaz dense » ou « liquide expansé ».

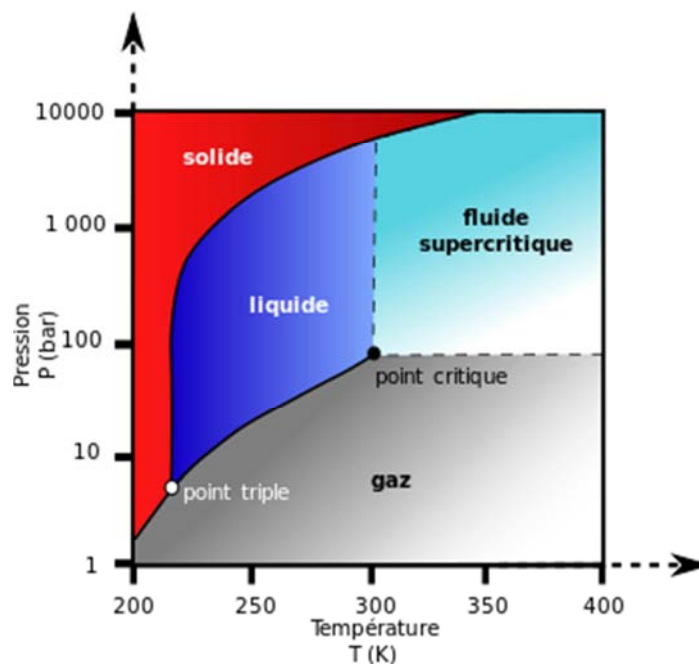


Figure 15 : Diagramme de phases du CO<sub>2</sub>

La Figure 16 présente la visualisation du passage à l'état supercritique.

Le milieu fluide supercritique est donc considéré comme intermédiaire entre les liquides et les gaz, à la fois dense et compressible.

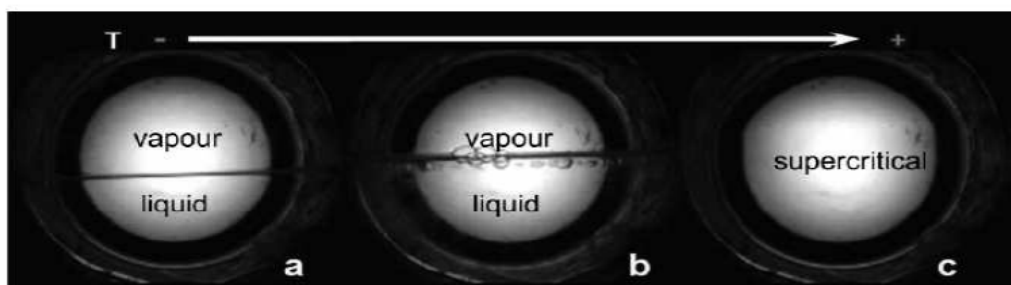


Figure 16 : Cellule d'observation permettant la visualisation du passage à l'état supercritique (Hobbs and Thomas, 2007)

- Séparation entre la phase liquide et gazeuse.
- L'interface liquide gaz commence à entrer en transition suite à une élévation de température.
- Les deux phases ne sont plus distinctes, l'état supercritique est atteint.

Plus généralement, les fluides supercritiques sont caractérisés par une masse volumique proche de celle de l'état liquide, une viscosité proche du gaz et une diffusivité intermédiaire entre les deux états (cf Tableau 3).

**Tableau 3 : Ordre de grandeur de la densité, viscosité et diffusivité des gaz, liquides et fluides supercritiques (Samvura and Totté, 2006)**

	<b>Densité <math>\rho</math> (g.cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Viscosité (<math>\mu</math>Pa.s)</b>	<b>Diffusivité (cm<sup>2</sup>. s<sup>-1</sup>)</b>
<b>GAZ</b>	0,6.10 <sup>-3</sup> à 2.10 <sup>-3</sup>	10 à 30	1.10 <sup>-1</sup> à 4.10 <sup>-1</sup>
<b>Fluide supercritique</b>	0,2 à 0,5	10 à 30	0,1.10 <sup>-3</sup> à 1.10 <sup>-3</sup>
<b>Liquide</b>	0,6 à 1,6	200 à 3000	0,2.10 <sup>-5</sup> à 2.10 <sup>-5</sup>

Il est à signaler qu'à proximité du point critique, la plupart des propriétés thermomécaniques du fluide présentent des singularités.

Les propriétés thermophysiques des fluides supercritiques sont donc ajustables par une simple modification de coordonnées thermodynamiques. Le fait par exemple de pouvoir ajuster la densité implique la possibilité d'adapter le fluide à l'application désirée.

La diffusion au sein du fluide supercritique est plus rapide et la viscosité plus faible que dans un liquide. Cela provient en partie de la faible densité des fluides supercritiques et également du fait de la petite taille des molécules de fluides généralement utilisés dans le domaine supercritique. Cette haute diffusivité, couplée à une faible viscosité et une densité proche des liquides confèrent des caractéristiques physiques idéales pour le transfert de matière. Les fluides supercritiques peuvent être utilisés pour de l'extraction (de Melo et al., 2014), en chromatographie, pour l'encapsulation de nanoparticules ou pour la synthèse organique (Matsuda, 2013). La miscibilité avec d'autres gaz, l'oxygène notamment est une propriété très intéressante dans le cas de catalyses oxydatives par exemple (Hammond et al., 1985). Les fluides supercritiques sont également étudiés dans le domaine de l'environnement pour l'élimination des polluants organiques par oxydation par l'eau supercritique (SCWO : supercritical water oxidation). L'extraction par les fluides supercritiques présente des avantages considérables par rapport à son homologue par solvant liquide, la disponibilité de solvants non toxiques tel que le CO<sub>2</sub>, les propriétés physico-chimiques des fluides favorables à l'extraction (haute diffusivité, faible viscosité, pas de tension de surface, un pouvoir solvant proche de celui des liquides) et qui de plus sont



ajustables dans l'ensemble du domaine supercritique, la réduction du temps d'extraction. Egalement, un grand intérêt de l'extraction par des solvants non toxiques est de pouvoir s'affranchir de l'étape d'élimination des résidus de solvants

Le Tableau 4 présente les conditions critiques de différents solvants, le CO<sub>2</sub> est adapté pour faire de la catalyse enzymatique car sa température critique (31 °C) est bien adaptée pour l'utilisation d'enzymes, en général désactivées pour des températures supérieures à 60 °C.

Tableau 4 : Masse moléculaire, température critique et pression critique de différents solvants (Samvura and Totté, 2006)

Solvant	Masse moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Température critique (°C)	Pression critique (bar)
Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> )	44,1	31,1	73,8
Eau (H <sub>2</sub> O)	18	374	220
Méthane (CH <sub>4</sub> )	16,04	-82,7	45,96
Ethane (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> )	30,07	32,2	48,8
Propane (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> )	44,1	96,6	42,5
Ethylène (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	28,05	9,5	50,76
Propylène (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> )	42,08	91	46,1

### 1.5.2. Le CO<sub>2</sub> supercritique

Le fluide supercritique le plus utilisé est donc le CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>SC).

Le CO<sub>2</sub>SC est généralement considéré comme un solvant GRAS (Generally Recognized As Safe), c'est-à-dire qu'il ne présente aucun inconvénient quant à son utilisation comme solvant dans un procédé satisfaisant aux critères du développement durable. Lors d'une synthèse organique dans du CO<sub>2</sub>SC l'extraction du solvant est facilitée car il suffit d'une dépressurisation jusqu'à la pression atmosphérique (CO<sub>2</sub> devient gaz). Gazeux dans des conditions de température et pression ambiantes, le CO<sub>2</sub> peut aussi facilement être récupéré et recyclé en fin de procédé. C'est pourquoi il est intéressant d'effectuer un couplage réaction/séparation (Paiva et al., 2011; Rezaei and Temelli, 2001), lors de cette étude ce couplage n'a pas pu être étudié mais il serait néanmoins très intéressant de l'envisager par la suite.

Il permet une excellente pénétration dans les matériaux macro et micro-poreux ce qui peut être très intéressant pour le nettoyage en profondeur de certains matériaux notamment médicaux.

Le CO<sub>2</sub>SC est déjà utilisé dans des applications industrielles (décaféination du café, extraction d'huiles essentielles...). L'extraction par les fluides supercritiques des huiles essentielles et des arômes à partir de produits naturels pour l'élaboration de produits nutraceutiques et alimentaires a marqué lui aussi un réel progrès.

Dans les applications pharmaceutiques, on citera l'élaboration de nouvelles formulations de médicaments (production de particules avec des propriétés différentes) mais aussi l'élimination de certaines impuretés liées aux procédés de synthèse.

Lors de cette étude la CO<sub>2</sub>SC sera utilisé comme solvant pour remplacer les solvants organiques habituels pour effectuer la résolution d'un mélange racémique par voie enzymatique. La biocatalyse en CO<sub>2</sub>SC a déjà largement été étudiée dans la littérature.

### **1.5.3. La biocatalyse en CO<sub>2</sub> supercritique**

La première catalyse enzymatique réalisée dans du CO<sub>2</sub>SC a été réalisée en 1985 par Hammond et al., (l'enzyme utilisée était une polyphénol oxydase) et Randolph et al., (l'enzyme utilisée était une alcaline phosphatase).

De nombreux travaux montrent l'utilisation de lipases en CO<sub>2</sub>SC (Blattner et al., 2006; Chulalaksananukul et al., 1993; Ciftci and Temelli, 2013; Habulin et al., 2008a; Holmes et al., 1998; Liu and Huang, 2010; Marty et al., 1992, 1990; Palocci et al., 2008; Rezaei et al., 2007). En particulier les lipases les plus utilisées en CO<sub>2</sub>SC sont le Novozyme 435 qui provient de *C. antarctica* (Habulin et al., 2008a; Lozano et al., 2004; Matsuda et al., 2005, 2004; Paiva et al., 2011), ou encore une lipase qui provient de *Mucor miehei* (le nom commercial était Lipozyme) (Chulalaksananukul et al., 1993; Rantakyla and Aaltonen, 1994).

Plus particulièrement la biocatalyse énantiosélective avec des lipases en CO<sub>2</sub>SC est décrite dans la littérature (Celebi et al., 2007; Matsuda, 2013; Matsuda et al., 2004; Salgin et al., 2007; Shekarchizadeh and Kadivar, 2012) ce qui encourage l'étude des lipases en CO<sub>2</sub>SC pour la réaction souhaitée.

De nombreux travaux ont eu pour but de remplacer le solvant organique (décane, hexane, DMF...) en utilisant le CO<sub>2</sub>SC (Chulalaksananukul et al., 1993; Marty et al., 1992, 1990; Matsuda et al., 2005). Cet échange de solvant peut entraîner des diminutions d'activité, de stabilité des enzymes, une moins bonne solubilité... mais le procédé doit être pris en compte dans sa globalité, les étapes de purification sont souvent coûteuses et complexes c'est pourquoi il est souvent intéressant d'utiliser peu ou pas de solvant organique. De plus les procédés dits verts sont de plus en plus appréciés par l'opinion publique étant donné les préoccupations environnementales actuelles. Il est plus que probable qu'à l'avenir les industriels accepteront une perte de rendement sur le procédé si cela permet une baisse des coûts de traitement des effluents.

La stratégie habituelle pour réaliser une biocatalyse en CO<sub>2</sub>SC est d'utiliser le CO<sub>2</sub> comme seul solvant, l'enzyme est utilisée immobilisée.

L'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique n'a pas été étudié en CO<sub>2</sub>SC mais ce n'est pas le cas pour les profènes d'intérêt.

### 1.5.3.1. Les profènes en CO<sub>2</sub> supercritique

Il est important de connaître la solubilité des profènes (ou des esters associés) en CO<sub>2</sub>SC pour pouvoir garantir que celui-ci pourra être utilisé comme solvant de réaction. Cela a déjà été étudié (Coimbra et al., 2006; Macnaughton et al., 1996). On remarque que c'est l'ibuprofène qui est le plus soluble des trois profènes étudiés (ce qui est cohérent avec ce qui se produit en décane), 1000 fois plus soluble, (fraction molaire de  $58,5 \cdot 10^{-5}$  à 90 bar 40 °C), alors que la solubilité du naproxène et kétoprofène est faible (fraction molaire de 0,2 et  $0,4 \cdot 10^{-5}$  à 90 bar 40 °C) (Coimbra et al., 2006).

L'estérification de l'ibuprofène a été effectuée en CO<sub>2</sub>SC par une lipase immobilisée provenant de *Mucor miehei* (Lipozyme IM 20) (Rantakyla and Aaltonen, 1994). La stratégie classique en CO<sub>2</sub>SC a été employée, à savoir l'enzyme immobilisée en système dit monophasique et une réaction d'estérification. Cependant cette enzyme ne possédait pas une énantiosélectivité suffisante pour permettre une séparation complète des deux énantiomères.

L'hydrolyse énantiosélective d'un ester du naproxène par un mélange de lipases provenant de *C. rugosa* en présence de CO<sub>2</sub>SC a également été réalisée. Cependant cela a été réalisée dans une configuration : tampon phosphate / isooctane / CO<sub>2</sub>SC (Salgin et al., 2007). Dans ce cas l'intérêt du CO<sub>2</sub> n'est pas de remplacer la phase organique mais d'améliorer l'énantiosélectivité.

Dans le cas d'une catalyse en système monophasique avec enzyme immobilisée (par opposition à un système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*), il faut bien noter que le contrôle de l'activité de l'eau est cruciale pour conserver une bonne activité de l'enzyme (Marty et al., 1992, 1990).

#### 1.5.3.2. Rôle de l'eau et activité de l'eau

En effet une quantité minimale d'eau est indispensable à la fonction catalytique et à la stabilité de l'enzyme. L'eau est impliquée dans de nombreuses interactions non covalentes qui sont nécessaires au maintien de la conformation active de l'enzyme. A partir du moment où l'eau essentielle est localisée autour des enzymes, l'environnement peut être un solvant organique ou du CO<sub>2</sub>SC. Cependant l'eau se partagera entre les différentes phases : liée à l'enzyme, dissoute dans le solvant, adsorbée sur d'autres composants solides comme le support de l'enzyme (si celle-ci est immobilisée)... le paramètre pertinent pour caractériser l'hydratation du système est alors l'activité thermodynamique de l'eau ( $a_w$ ) et non pas sa concentration (Halling, 1994, 1990). Lorsque l'équilibre thermodynamique est atteint, l'activité de l'eau est la même dans toutes les phases. L'activité de l'eau représente la disponibilité en eau du système.

Le CO<sub>2</sub>SC est capable de solubiliser selon la température et la pression entre 0,3 % et 0,5 % massique d'eau (Knez and Habulin, 2002; Michor et al., 1996).

La Figure 17 présente la solubilité de l'eau dans le CO<sub>2</sub>SC en fonction des conditions et est supérieure à sa solubilité dans le décane par exemple (1,4 g/L à 32 °C 100 bar). De ce fait le CO<sub>2</sub> peut « assécher » ou « surhydrater » l'enzyme si ce paramètre n'est pas pris en compte. De plus le support qui est utilisé pour immobiliser l'enzyme va lui aussi adsorber une partie de l'eau et cet effet doit être pris en compte.

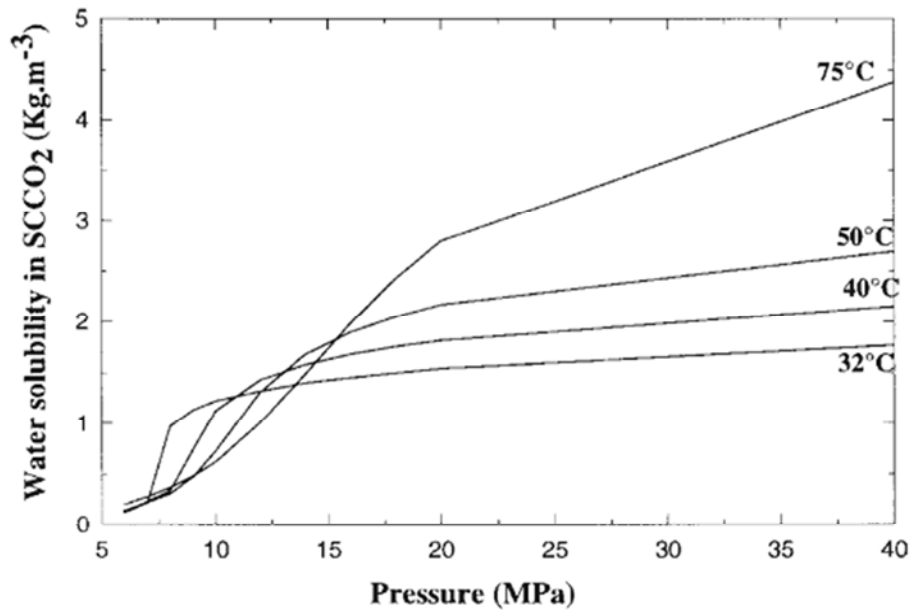


Figure 17 : Solubilité de l'eau dans le CO<sub>2</sub>SC  
 Courbe réalisée à partir de points expérimentaux et modélisation basée sur l'équation de Chrastil (Marty and Condoret, 2001; Wiebe and Gaddy, 1941)

Condoret et al., 1997 ont proposé une méthode pour estimer la valeur de l' $a_w$  en CO<sub>2</sub>SC.

Une modélisation de la distribution CO<sub>2</sub>/eau à la surface de la lipase *C. antarctica* en milieu diphasique a été proposée (cf Figure 18, (Silveira et al., 2012)). Rappelons que cette lipase ne possède pas de volet moléculaire. En observant cette image on peut constater une distribution bien marquée des deux constituants (CO<sub>2</sub>, eau), l'eau étant plutôt sur la face postérieure de l'enzyme.

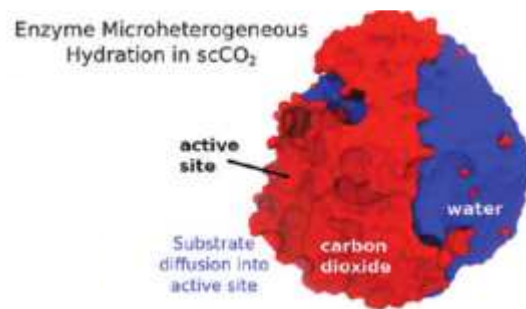


Figure 18 : Distribution de l'eau et du CO<sub>2</sub> à la surface de la lipase de *C. antarctica* (Silveira et al., 2012)

### 1.5.3.3. La masse volumique

Les effets de la température et de la pression sur l'énantiosélectivité en CO<sub>2</sub>SC ont été étudiés (Hobbs and Thomas, 2007; Lozano et al., 2004; Matsuda, 2013; Matsuda et al., 2005, 2004, 2003; Rezaei et al., 2007). Ces facteurs ont un effet sur la sélectivité car une variation

de ces paramètres va faire évoluer notamment la masse volumique du CO<sub>2</sub>, ce qui aura d'importantes répercussions sur les interactions enzyme-CO<sub>2</sub> et donc la conformation de la protéine (Matsuda et al., 2003). Comme on peut le constater sur la Figure 19 une faible variation de pression peut induire une forte variation de masse volumique, notamment entre 70 et 100 bar voire 150 bar (cela dépend de la température).

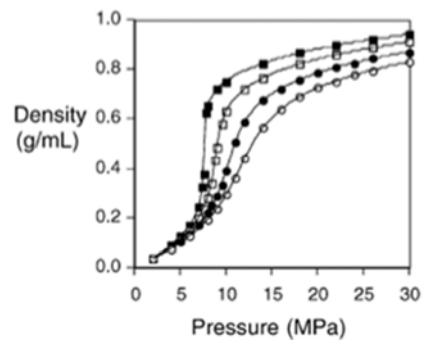


Figure 19 : Densité du CO<sub>2</sub> en fonction de la pression et température  
Carrés noirs 32 °C, vides 40 °C, cercles noirs 50 °C et cercles vides 60 °C (Matsuda et al., 2004; Moriyoshi et al., 1993)

#### 1.5.3.4. Les carbamates

La formation de carbamates pour des enzymes au contact du CO<sub>2</sub> a été reportée pour la première fois en 1948 (Wright and Moore, 1948). Elle provient de l'interaction entre le CO<sub>2</sub> et les groupes amines libres, cf Figure 20. Ces carbamates pourraient être à l'origine d'un changement de sélectivité des enzymes, parfois de façon positive ou plus généralement de façon négative (Celebi et al., 2007; Hobbs and Thomas, 2007; Matsuda, 2013; Matsuda et al., 2005, 2004, 2003).

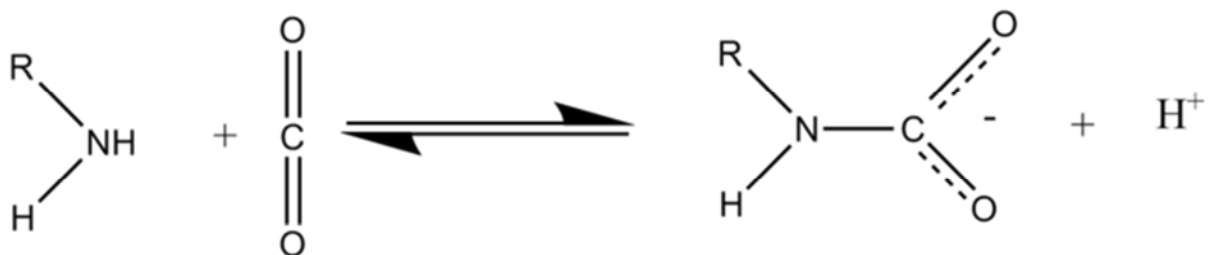


Figure 20 : Formation de carbamate, réaction entre une lysine et le CO<sub>2</sub>

#### 1.5.3.5. Pression et cycle de pressurisation et dépressurisation

Les effets de la pression sur l'activité et l'énantiosélectivité des enzymes en milieu CO<sub>2</sub>SC ont été étudiés (Eisenmenger and Reyes-De-Corcuera, 2009; Hobbs and Thomas, 2007; Knez, 2009; Matsuda, 2013; Matsuda et al., 2005, 2004, 2003; Rezaei et al., 2007). Il est difficile

d'établir des règles claires, en effet la pression va influencer de nombreux paramètres. La pression va avoir une influence sur : la solubilité des produits, la densité, la formation de carbamates, l'hydratation de la protéine si l' $a_w$  n'est pas contrôlée, l'hydrophobicité ou la polarité du solvant  $\text{CO}_2$  et le pH. C'est pourquoi il est tantôt reporté un effet neutre, tantôt positif, tantôt un effet négatif de la pression sur l'activité ou la sélectivité de l'enzyme (Blattner et al., 2006; Dijkstra et al., 2007; Habulin et al., 2008b; Liu and Huang, 2010; Olsen et al., 2006; Romero et al., 2005; Sovová and Zarevúcka, 2003). L'effet de la pression est dépendante des conditions testées (les gammes de pression/température), de la réaction, de l'enzyme (la nature et l'état : libre ou immobilisée).

La pressurisation/dépressurisation peut avoir un effet négatif sur l'enzyme (Habulin and Knez, 2001). Cet effet doit être pris en compte dans le cas de fonctionnements « batch » où l'enzyme immobilisée doit être réutilisée.

### 1.5.3.6. La constante diélectrique et le log P

La Figure 21 présente les variations de la constante diélectrique du  $\text{CO}_2$  en fonction de la pression et de la température. C'est un paramètre qui permet d'évaluer l'hydrophobicité d'un milieu. Une forte augmentation de la constante diélectrique est observée entre 70 et 150 bar, en effet une telle variation de pression entraîne une augmentation de la constante diélectrique de 1,1 à 1,5 à 32 °C. Une plus forte variation de cette constante est observée à 32 °C qu'à 60 °C, à 125 bar la constante diélectrique est égale à 1,5 à 32 °C et 1,2 à 60 °C. Le Log P est aussi un paramètre pour évaluer l'hydrophobicité. Il s'agit du logarithme du coefficient de partition d'un solvant entre le 1-octane-1-ol et l'eau en système diphasique. Nakaya et al. ont montré qu'une augmentation de la pression de 30 à 118 bar conduisait à une augmentation du logP du  $\text{CO}_2$  de 0,9 à 2, donc une augmentation de l'hydrophobicité (Nakaya et al., 2001). Il a été montré que les meilleurs résultats de catalyses enzymatiques sont obtenus avec les solvants possédant un  $\log P > 4$ , donc avec une forte hydrophobicité (Kraai et al., 2008), ce phénomène a été mis en relation avec la nécessité de la présence d'eau autour de l'enzyme pour qu'elle soit active. Plus un solvant est hydrophobe, moins il extrait d'eau du microenvironnement de l'enzyme.

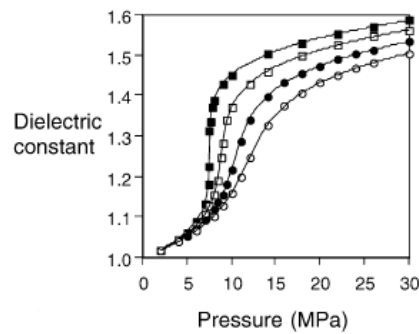


Figure 21 : Constante diélectrique du CO<sub>2</sub> en fonction de la pression et température  
Carrés noirs 32 °C, vides 40 °C, cercles noirs 50 °C et cercles vides 60 °C (Matsuda et al., 2004; Moriyoshi et al., 1993)

#### 1.5.3.7. La température

La température est un paramètre très important lors de la mise en œuvre d'un procédé biocatalytique. Afin de pouvoir optimiser la température il est intéressant de connaître la température optimale de l'enzyme mise en jeu dans la réaction. L'activité catalytique augmente avec la température dans un premier temps (application de la loi d'Arrhenius sur la cinétique) et a tendance à décroître à hautes températures par inactivation thermique.

Cependant en milieu supercritique il faut également prendre en compte les effets de la température sur les propriétés physiques du solvant mais aussi la tension de vapeur des solutés. En effet, comme il a été précédemment décrit, les propriétés du CO<sub>2</sub>SC sont très sensibles à la température (également à la pression), notamment sa masse volumique qui détermine son pouvoir solvant.

#### 1.5.3.8. Procédé en diphasique

##### 1.5.3.8.1. Intérêt

De manière générale, il est intéressant d'employer un procédé en diphasique (Halling, 1987) pour différentes raisons. En effet il est possible de contourner le problème de l'inhibition ou une toxicité par le substrat ou produit grâce à la compartimentation chimique, cela favorise parfois un sens de réaction dans le cas d'une réaction réversible. Cette compartimentation peut être intéressante dans le cas d'inhibitions par les substrats et/ou produits. De plus dans certains cas une première séparation substrat/produit est effectuée si ces deux composés ne sont pas dans la même phase. L'enzyme peut être dans une phase différente du produit et



ainsi être réutilisée (procédé en continu du point de vue de la phase contenant le produit et en batch d'un point de vue de la phase contenant l'enzyme).

Dans notre cas le principal intérêt de l'utilisation d'un procédé en diphasique est de ne pas immobiliser l'enzyme (elle sera utilisée sous forme libre dissoute dans la phase aqueuse) et de pouvoir effectuer une réaction d'hydrolyse, qui nécessite de l'eau comme substrat, à la place de l'estérification. Dans le cas d'une lipase, la réaction se fera essentiellement à l'interface entre les deux phases. L'enzyme se positionnera à l'interface entre phase aqueuse et  $\text{CO}_2\text{SC}$ , le site actif dirigé vers la phase  $\text{CO}_2$ . De plus les esters des substrats d'intérêt considérés ici sont plus solubles dans une phase organique ou en phase  $\text{CO}_2\text{SC}$  que leur forme acide associée. Ainsi il serait possible de travailler avec des concentrations plus importantes en effectuant une réaction d'hydrolyse de ces esters.

L'utilisation d'un système diphasique a été peu étudiée mais quelques travaux sont tout de même disponibles avec l'utilisation d'une alcool déshydrogénase (Harada et al., 2009) ou encore de lipases (Lipase de *Pseudomonas cepacia*, une lipase porcine et lipase provenant de *Chronobacterium viscosum*) (Hartmann et al., 2001). La comparaison avec le système en solvant organique n'a pas été effectuée par ces auteurs (Harada et al., 2009, Hartmann et al., 2001) mais la possibilité d'utiliser le  $\text{CO}_2\text{SC}$  en système diphasique pour faire de la bioconversion a été validée. Une étude en microémulsion a également été réalisée. Dans ce cas des surfactants ont été ajoutés et une durée de réaction très courte (10 mn) a été considérée ce qui ne permet de détecter des effets à long terme de ce genre de système (Holmes et al., 1998).

Un phénomène attendu et à contrôler dans le cas où un système diphasique *phase aqueuse*/ $\text{CO}_2\text{SC}$  concerne la diminution du pH de la phase aqueuse du fait de la formation d'acide carbonique par dissolution du  $\text{CO}_2$ .

### 1.5.3.8.2. Le pH de la phase aqueuse

La solubilisation du  $\text{CO}_2$  dans la phase aqueuse entraîne la formation d'acide carbonique suivant la réaction présentée en Figure 22.

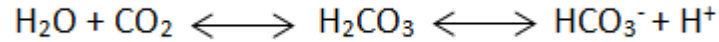
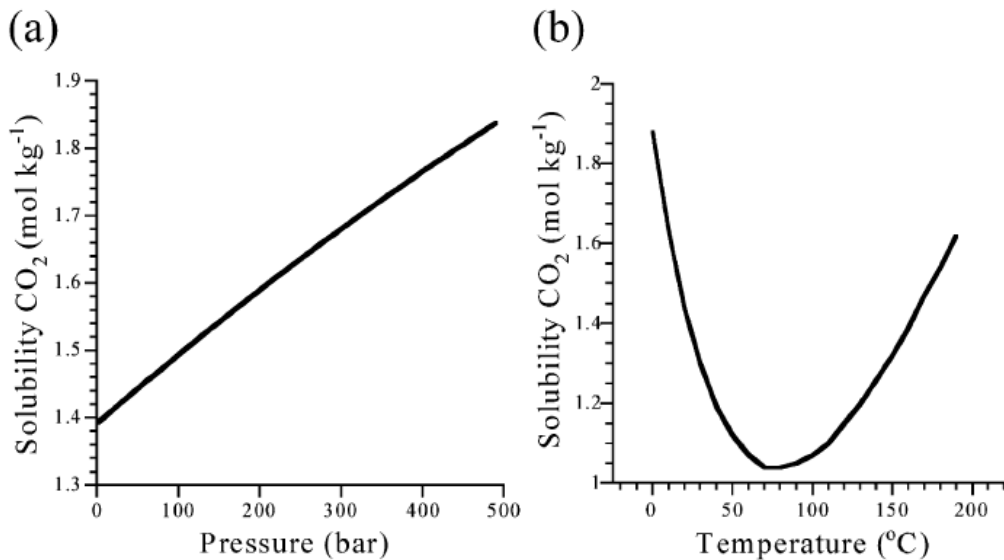


Figure 22 : Formation d'acide carbonique et sa dissociation

Comme le montre la Figure 23 la solubilité du  $\text{CO}_2$  dans la phase aqueuse dépend des conditions de pression et température. A température constante cette solubilité augmente avec la pression. A pression constante en revanche la solubilité décroît dans un premier temps puis ré-augmente à partir de 80 °C. Certains auteurs évoquent que la formation d'acide carbonique peut même en système monophasique jouer un rôle dans l'activité de l'enzyme du fait de l'abaissement du pH dans le microenvironnement de l'enzyme (Knez, 2009).

Figure 23 : La solubilité du  $\text{CO}_2$  dans l'eau en fonction de la pression et de la température (Ziegler et al., 2003)

- (a)  $T=20^{\circ}\text{C}$   
 (b)  $P=50$  bar

Dans les conditions d'étude le pH de la phase aqueuse va décroître pour atteindre un pH d'environ 3 (cf Figure 24).

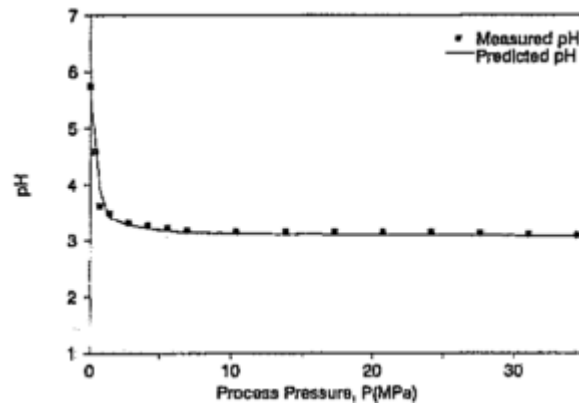


Figure 24 : pH en fonction de la pression d'un système diphasique *eau/CO<sub>2</sub>* à 32 °C (Meysami et al., 1992)

Un tel pH n'est en général pas compatible avec une bonne activité des enzymes envisagées. Dans la littérature la stabilisation du pH de la phase aqueuse d'un tel système diphasique à un pH qui sera adapté à l'activité de l'enzyme a déjà été proposée. Pour ce faire l'utilisation d'une base telle que NaOH ou encore différents tampons a été envisagée (Holmes et al., 1999, 1998; Roosen et al., 2007; Ziegler et al., 2003). Le Tableau 5 présente quelques exemples. Pour une alcool deshydrogénase l'ajout de bicarbonate de sodium a permis d'accroître l'activité en augmentant le pH de la phase aqueuse dans un système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* (Harada et al., 2009).

Tableau 5 : Valeurs expérimentales du pH pour différents tampons, en fonction de la température et de la pression (Holmes et al., 1999)

buffer	temp (°C)	pressure (bar)	biphasic pH	microemulsion pH
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.5 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	5.75	5.96
	50	345	5.79	5.87
	35	207	5.80	5.90
	35	310	5.75	5.88
Tricine (0.8 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	5.57	5.49
	50	345	5.63	5.55
	35	207	5.57	5.53
HEPES (1 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	5.58	5.48
	50	345	5.95	6.05
	35	207	5.91	6.15
BES (1 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	5.97	6.09
	50	345	5.93	6.07
	35	310	5.67	5.90
NaHCO <sub>3</sub> (0.5 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	5.65	5.84
	50	345	5.65	5.94
	35	207	5.61	5.90
	35	310	5.41	5.63
MES (1 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	5.45	5.66
	50	345	5.42	5.67
	35	207	5.40	5.65
	35	310	5.49	5.76
NaOH (1 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	5.49	5.73
	50	345	5.49	5.73
	35	207	5.50	5.76
	35	310	5.76	5.83
NaOH (1.5 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	5.82	5.87
	50	345	5.84	5.91
	35	310	5.85	5.88
NaOH (1.5 mol kg <sup>-1</sup> )	30	345	6.67	6.62
	35	345	6.70	6.86

Avant d'étudier le procédé en CO<sub>2</sub>SC, en remplacement des solvants organiques, en système monophasique ou diphasique, il est impératif de mettre en évidence des enzymes possédant une énantiosélectivité satisfaisante ( $E > 200$ ) vis-à-vis des quatre substrats d'intérêt. Différentes stratégies pourront être employées pour déterminer rapidement une enzyme répondant aux critères d'énantiosélectivité ( $E > 200$ ) et également une vitesse de conversion la plus importante possible, c'est l'objectif du prochain Chapitre.



# **Chapitre II : Recherche d'enzymes énantiosélectives pour la résolution de profènes**



## Chapitre II : Recherche d'enzymes énantiosélectives pour la résolution de profènes

### 2.1. Introduction Chapitre II

Il est indispensable de parvenir à obtenir un énantiomère pur lors de la production d'un médicament, car les énantiomères peuvent avoir des effets très différents (cf 1.1.1). Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe 1.1.2, il existe différentes méthodes permettant la séparation d'énantiomères. La voie que nous avons choisi de privilégier est la voie enzymatique, qui permettra la séparation des énantiomères à partir d'un mélange racémique, via une lipase. En effet, les lipases ont un fort potentiel pour la résolution de mélanges racémiques du fait de leur versatilité, de leur tolérance pour les solvants organiques et de leur énantiosélectivité naturelle. Toutefois la recherche d'une enzyme qui aura une énantiosélectivité suffisante ( $E > 200$ ) vis-à-vis d'un substrat donné reste un défi. Rappelons que les quatre substrats d'intérêt dans notre étude sont l'ibuprofène, le naproxène, le kétoprofène et l'acide 2-bromo phényl acétique. Pour effectuer la séparation des énantiomères, l'enzyme va effectuer une réaction énantiosélective à partir du mélange racémique. Dans le cadre de cette étude, l'hydrolyse de la forme ester a tout d'abord été étudiée.

Comme évoqué dans le paragraphe 1.4.6, deux mutants de la lipase Lip2p de *Yarrowia lipolytica* avec une énantiosélectivité supérieure à 200 vis-à-vis de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique ont déjà été identifiés avant les travaux de thèse :

- Le monomutant V232S de la lipase Lip2p de *Y. lipolytica* possède une énantiosélectivité supérieure à 200, avec une énantiopréférence pour l'énantiomère (S) (Bordes et al., 2009)
- Le double mutant D97A-V232F de la lipase Lip2p de *Y. lipolytica* possède une énantiosélectivité supérieure à 200, avec une énantiopréférence pour l'énantiomère (R) (Cambon et al., 2010a)

En revanche, il est intéressant de trouver d'autres enzymes énantiosélectives pour la résolution du mélange racémique de l'ibuprofène, du naproxène et du kétoprofène qui est le premier objectif de ces travaux de thèse (cf Chapitre I, paragraphe 1.4).



L'objectif du travail résumé dans ce chapitre est donc de trouver une enzyme permettant de séparer les énantiomères des esters de l'ibuprofène, du naproxène et du kétoprofène de façon efficace.

Deux méthodes ont été employées et ont fait l'objet de deux publications en cours de soumission :

- l'amélioration par génie génétique d'une enzyme prometteuse, à savoir la lipase Lip2p de *Y. lipolytica* pour la résolution de l'ibuprofène, du naproxène et du kétoprofène.

1. Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered *Yarrowia lipolytica* Lip2p lipase.

- l'exploration par homologie d'une collection d'enzymes restreinte issue de la biodiversité naturelle permettant d'isoler des enzymes nouvelles pour la résolution de molécules chirales.

2. Screening of a semi-rational lipases library for the resolution of racemic esters of arylalkyl carboxylic acids.

## **2.2. Recherche d'enzymes énantiosélectives pour la résolution des esters éthyliques de l'ibuprofène, du naproxène et du kétoprofène**

### **2.2.1. Introduction de la publication**

La lipase Lip2p de *Y. lipolytica* a été montrée efficace pour la résolution de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique, appartenant à une classe importante d'intermédiaires de produits pharmaceutiques. L'énantiosélectivité de la lipase a été améliorée par mutagenèse dirigée au niveau du site de liaison avec le substrat. Pour guider les cibles de mutagenèse, la modélisation moléculaire et le modèle tri-dimensionnel de la lipase ont été utilisés. Une banque de mutants a été construite et une enzyme possédant une énantiosélectivité infinie envers l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique a ainsi été isolée (Bordes et al., 2009).

Dans la publication ci-dessous, la lipase Lip2p sauvage de *Y. lipolytica* a été dans un premier temps comparée à la lipase la plus efficace en terme d'énantiosélectivité vis-à-vis de l'ibuprofène, du naproxène et du kétoprofène connue dans la littérature, le mélange d'isoformes de lipases de *Candida rugosa* (Kim et al., 2000; Lee et al., 1995; Liu et al., 2004; Manetti et al., 2000; Steenkamp and Brady, 2003; Xi and Xu, 2005; Xin et al., 2005; Zhu et al., 2005). Dans un second temps, la banque de mutants précédemment construite (Bordes et al., 2009), ainsi qu'une banque de saturation sur un acide aminé du site actif de Lip2p dont le choix a été guidé par modélisation moléculaire ont été testées pour la résolution de l'ester éthylique de l'ibuprofène, du naproxène et du kétoprofène. Ceci a permis d'isoler des mutants efficaces pour la résolution de chacun des esters choisis.

**2.2.2. Publication: Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered *Yarrowia lipolytica* Lip2p lipase**



## Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered *Yarrowia lipolytica* Lip2p lipase

Doriane Gérard<sup>1,2,3</sup>, Marc Guérault<sup>1</sup>, Leticia Casas-Godoy<sup>1</sup>, Jean-Stéphane Condoret<sup>2,3</sup>,  
Isabelle André<sup>1</sup>, Alain Marty<sup>1\*</sup>, Sophie Duquesne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

<sup>2</sup> University of Toulouse; INPT, UPS Laboratoire de Génie Chimique; Toulouse France

<sup>3</sup> CNRS, UMR 5503, F-31062 Toulouse, France

\* Corresponding authors: Sophie Duquesne & Alain Marty, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés, Institut National des Sciences Appliquées, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex4, France, Tel : +33 (0)5 61 55 94 39, Fax : +33 (0)5 61 55 94 00, Email : [sophie.duquesne@insa-toulouse.fr](mailto:sophie.duquesne@insa-toulouse.fr) & [alain.marty@insa-toulouse.fr](mailto:alain.marty@insa-toulouse.fr)

### Abstract

Enzyme-catalyzed enantiomer discrimination is still a great challenge for the development of industrial pharmaceutical processes. For the resolution of ibuprofen, naproxen and ketoprofen racemates, three major anti-inflammatory drugs, only lipases from *Candida rugosa* present a high selectivity if solvent and surfactant use is discarded. However, their catalytic activities are too low for utilization in a process. In the present work, we demonstrate that the lipase Lip2p from the yeast *Yarrowia lipolytica* presents a higher catalytic activity than *C. rugosa* lipases to hydrolyze ethyl esters of ibuprofen, naproxen and ketoprofen, but its selectivity is still not sufficient ( $E=52$  (*S*); 11 (*S*) and 1.5 (*R*) respectively). Therefore, its enantioselectivity was further improved by site-directed mutagenesis experiments, targeted at the substrate binding site and guided by molecular modelling studies. By investigating binding modes of the (*R*) and (*S*) enantiomers in the active site, two amino acid residues located in the hydrophobic substrate binding site of the lipase, namely residues 232 and 235, were identified to likely play a role in the enantioselectivity (*S* enantiopreference) and activity of Lip2p towards ethyl ibuprofen and naproxen esters, respectively. The enantioselectivity of Lip2p towards ethyl ibuprofen esters was rendered infinite ( $E \gg 300$ ) by replacing V232 by A or C residues. Substitution of V235 by C, M, S, or T amino acid led to a tremendous increase in the

enantioselectivity ( $E \gg 300$ ) towards naproxen ethyl ester. Variant V232F enabled efficient kinetic resolution of ethyl ketoprofen ester enantiomers (*(R)* enantiopreference;  $E \gg 300$ ). In addition to the gain in selectivity, a remarkable increase in velocity by 2.6, 2.7 and 2.5 times, respectively, was found for ibuprofen, naproxen and ketoprofen ethyl esters.

**Keywords:** Enzyme, enantioselectivity, *Yarrowia lipolytica*, lipase, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, kinetic resolution, enzyme evolution.

## 1. Introduction

$\alpha$ -substituted aryl and alkyl carboxylic acids are important intermediates encountered in synthetic pathways of numerous drugs, such as prostaglandin, prostacyclin, semi-synthetic penicillin and thiazolium salts. Among them, derivatives of 2 arylpropionic acids, 2-(4-isobutylphenyl) propionic acid, commonly named ibuprofen, 2-(6-methoxy-2-naphthyl) propionic acid, also called naproxen, and 2-(3-benzoylphenyl) propionic acid, commonly named ketoprofen are regularly used as non-steroid anti-inflammatory drugs (NAIDs) in the treatment of headache, rheumatoid arthritis, cephalgiac or muscular cells<sup>1</sup>.

All these molecules present an asymmetric carbon at the  $\alpha$  position of the carboxylic function, leading to the co-existence of two enantiomers. In most cases, only one enantiomer exerts the required biological activity. For instance, the (*S*) enantiomer of ibuprofen is 160 times more active than its (*R*) counterpart<sup>2,3</sup>. Similarly, the (*S*) enantiomer of naproxen is 28 times more active than the (*R*) form<sup>4</sup>. The anti-inflammatory property of ketoprofen is principally due to the (*S*) enantiomer, whereas the (*R*) enantiomer has side effect<sup>5</sup>. The use of the only active enantiomer is thus often privileged whenever it can be obtained in a pure form. Therefore, a major challenge consists in separating these enantiomers to obtain a pure biologically active substance. Classical methods used to obtain pure enantiomers, such as chemical asymmetric synthesis, stereoselective crystallization or chiral chromatography, are usually expensive. The use of highly enantioselective enzymes (enantioselectivity value,  $E$ , ratio of reaction rates for both enantiomers higher than 200) thus appears as an appealing alternative to separate such enantiomers.

Several enzymatic routes were explored for the obtention of profens and profenols<sup>6</sup>, such as use of alcohol dehydrogenases<sup>7-10</sup>, arylmalonate decarboxylases, ene reductases<sup>11</sup> and

nitrilases, either based on the kinetic resolution of racemates or asymmetrization of prochiral precursors.

In the case of 2-arylpropionic acids, lipases have shown to be good candidates to catalyze the kinetic resolution of (*R*, *S*) racemates, either by hydrolysis of an ester or by esterification of the acid form. Several lipases from various origins (plant and microbial) have already been reported for the resolution of ibuprofen, naproxen and ketoprofen esters or corresponding acids.

Lipases from *Rhizomucor miehei*<sup>12</sup>, *Carica papaya*<sup>13</sup> or evolved *Candida antarctica* lipase<sup>14,15</sup>, were previously tested for the resolution of (*R*, *S*) ibuprofen racemate by either hydrolysis or esterification reactions. However, all three of them led to a low enantioselectivity ( $E < 200$ ). The lipase from *C. rugosa* (formerly *C. cylindracea*) was shown to be the best enzyme to discriminate (*R*, *S*) ibuprofen racemate<sup>16–28</sup>. The best result, considering the enantioselective hydrolysis of ibuprofen racemate using free enzyme, presents an enantioselectivity of 247<sup>16</sup>. Nevertheless, this high *E* was obtained by addition of *N,N*-dimethylformamide, which is highly toxic.

*C. rugosa*, *C. papaya* and *R. miehei* free lipases were also studied for the hydrolysis of naproxen ester racemate<sup>13,17,29–35</sup>. Among them, lipases from *C. rugosa* were found to be the most enantioselective enzymes for this reaction ( $E = 397$ )<sup>32</sup>. Lysophospholipase and carboxylesterase were also studied for the resolution of naproxen ester<sup>36,37</sup>: the carboxylesterase NP presents a high enantioselectivity (*E* of 500), nevertheless, this high enantioselectivity was obtained by addition of formaldehyde, which is highly toxic<sup>37</sup>.

Lipases from *Thermogota maritima*<sup>38</sup>, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*<sup>39</sup>, *Mucor javanicus*<sup>40,41</sup>, *Mucor miehei*<sup>40,41</sup>, *Trichosporon laibacchii*<sup>42</sup>, *Pseudomonas cepacia*<sup>40</sup>, *Carica papaya*<sup>13</sup>, *Bacillus subtilis*<sup>43</sup> and from *Candida rugosa*<sup>19</sup> were previously tested for the resolution of (*R*, *S*) ketoprofen racemate. However, all of them led to a poor enantioselectivity ( $E < 200$ ). To improve enantioselectivity of the lipase from *Candida rugosa* ( $E = 27$ )<sup>19</sup>, various strategies were employed such as enzyme immobilization<sup>44–46</sup> or two step acetone treatment<sup>18</sup> but only an enantioselectivity of 153 was reached<sup>44</sup>.

The enantioselectivity of *Serratia marcescens* lipase was improved (from 63 to 1084) by addition of a surfactant Brij 92V<sup>47</sup>. Similarly, the enantioselectivity of *Pseudomonas* sp.KCTC10122BP lipase<sup>48</sup> and *Acinetobacter* lipase and were found superior to 200 (absolute and 752, respectively) but with use of triton X-100<sup>49</sup>. However, addition of a surfactant generally leads to a complexification of the purification process, and to high production costs.

Variants of *C. Antarctica* lipase CalB, and of the recently metagenome-isolated esterase Est25<sup>50</sup> enabled an enantioselectivity higher than 200<sup>14</sup>, but very low concentration of substrate were used.

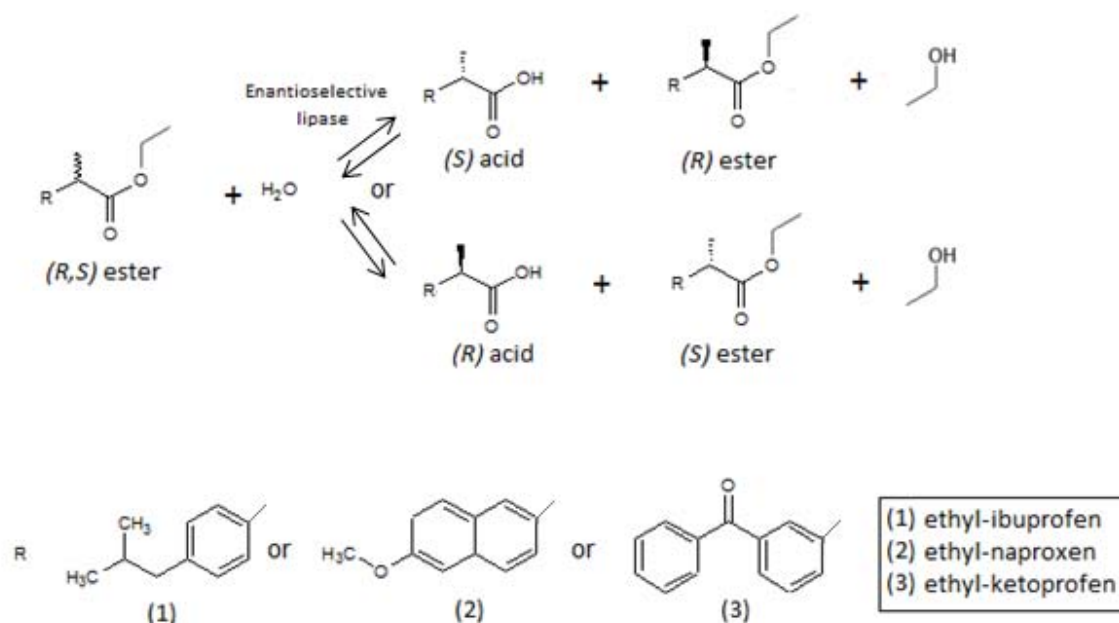
It appears that the lipases from *C. rugosa* are good candidates for the resolution of the three substrates considered. Despite their significant enantioselectivity, the catalytic efficiencies of the lipases from *C. rugosa* are quite low, almost one order of magnitude lower than that of Lip2p lipase from the oleaginous yeast *Y. lipolytica*<sup>51,52</sup> during resolution of 2-bromophenyl acetic acid ester.

The objective of the present study is to identify new enzymes able to highly discriminate the (*R*, *S*) enantiomers of ibuprofen, naproxen and ketoprofen ethyl esters, and presenting high catalytic efficiency. The *Y. lipolytica* Lip2p lipase was reported to catalyze the resolution of ibuprofen racemate with a low enantioselectivity ( $E=56$ )<sup>53</sup>. Moreover, variants of this lipase were shown to have a high catalytic efficiency and enantioselectivity for the resolution of (*R*, *S*) 2-bromophenyl acetic acid ester racemate<sup>52,54</sup>. Enzyme variants with increased or totally inverted enantioselectivity, concomitant with a remarkable increase in velocity, were also obtained<sup>55</sup>. Performances of *Y. lipolytica* wild-type lipase is compared to wild-type lipases (CRL 1 and 4) from *C. rugosa*, described in the literature as being the most efficient enzymes for the resolution of the considered racemates<sup>16,19,34,44</sup>. In view of the results, the library of Lip2p variants from *Y. lipolytica*, previously built for the resolution of the (*R*, *S*) 2-bromophenyl acetic acid ester racemate, was tested on the three molecules and molecular modelling was used to identify new targets for site-directed mutagenesis and to understand the role of amino acid changes on the selective recognition of the (*R*, *S*) enantiomers of each racemate.

## 2. Results and discussion

### 2.1 Resolution of (*R*, *S*) ibuprofen naproxen and ketoprofen ethyl ester racemates using wild-type lipases

The reaction scheme of an enantioselective lipase-catalyzed hydrolysis of the racemic mixture of three different esters is presented in Figure 1.



**Figure 1.** Reaction scheme of the lipase-catalyzed resolution of (*R*, *S*) ethyl ester racemate of ibuprofen, naproxen and ketoprofen by a (*R*) or (*S*) enantioselective lipase.

Wild-type Lip2p from *Y. lipolytica* was compared to *C. rugosa* lipases (CRL 1 and 4), the most efficient enzymes known to date for the resolution of ibuprofen, naproxen and ketoprofen racemates. CRL lipases were produced in recombinant form by a strain of *Y. lipolytica* as pure isoform of CRL1 and CRL4<sup>51</sup>.

All three lipases were produced using the *Y. lipolytica* strain JMY1212<sup>56</sup>, in which the lipase encoding gene is introduced in the genome at the zeta docking platform, leading to good reproducibility of the enzyme expression and enabling a comparison of enzyme variant activities directly from the supernatant<sup>55</sup>. In addition, this strain is deleted for the main extracellular protease (XPR2) and the main extracellular lipases (Lip2, 7 and 8) which enable high protein purity in the supernatant to be obtained<sup>57-59</sup>. It was checked that with this strain no activity is obtained whatever the used racemate (data not shown).



The protein contents of *Y. lipolytica* supernatant containing Lip2p, CRL1 or CRL4 were compared by SDS page (data not shown). Enzyme concentration was estimated as 5 times lower for CRL1 and CRL4 expressed in *Y. lipolytica* compared with Lip2p. The two enzymes of *C. rugosa* were then 10 times concentrated for comparison.

Enzymes were then tested during the hydrolysis of ibuprofen, naproxen and ketoprofen ethyl esters (Table 1).

**Table 1.** Comparison between activities and selectivities of Lip2p from *Y. lipolytica* and *C. rugosa* lipases for the hydrolysis of ethyl-ibuprofen, ethyl-naproxen and ethyl-ketoprofen. The hydrolysis was performed in a biphasic medium: 750  $\mu$ L of decane containing 50 mM of ester racemate, 750  $\mu$ L of enzyme supernatant (or the concentrate supernatant for CRL lipases). Stirred at room temperature for 100 h.

	Ethyl ibuprofen			Ethyl naproxen			Ethyl ketoprofen		
	viS ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	viR ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	E (viS/viR)	viS ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	viR ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	E (viS/viR)	viS ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	viR ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	E (viS/viR) or (viS/viR)
CRL1 10X	0.28	0	>200 (S)	0.15	0	>200 (S)	0,06	0	>200 (S)
CRL4 10X	0	0	Nd	0	0	Nd	0	0.99	>200 (R)
Lip2p 1X	1.56	0.03	52 (S)	0.42	0.04	11 (S)	0.11	0.16	1.5 (R)

Our results confirmed that *C. rugosa* lipase CRL1 is an efficient enzyme from the point of view of enantioselectivity to discriminate enantiomers of ibuprofen, naproxen and ketoprofen ethyl esters, with a total preference for the (S) enantiomer. Nevertheless, whatever the racemate, and even after a 10 times concentration of the supernatant, the rate of reaction is low. Surprisingly, even sharing 81 % of identity with CRL1, the lipase CRL4 is only active on ketoprofen ethyl ester with a total preference for the (R) enantiomer.

Wild-type Lip2p lipase from *Y. lipolytica* showed a clear preference for the (S) enantiomer in the hydrolysis of ibuprofen ethyl ester racemate (E=52, Table 1). This result is in agreement with the E of 56 obtained in previous studies<sup>53</sup> of esterification of ibuprofen using immobilized Lip2p lipase. The positive influence of a *para* substitution of the phenyl group on the E of Lip2p lipase was already observed for transesterification of 2-bromo-phenyl acetic ethyl and 2-bromo-*p*-tolylacetic ethyl ester<sup>60</sup>. Indeed, the presence of a methyl group in the *para* position of the phenyl group led to an improvement of the selectivity of Lip2p lipase towards the (S) enantiomer with an E of 28 against an E of 3 in the absence of the methyl group<sup>60</sup>. The presence of an isobutyl group<sup>60</sup> at the *para* position of the phenyl group in ibuprofen ester seemed to have the same effect.

The steric hindrance of the naproxen ethyl ester in the Lip2p lipase active site is clearly more important than the one of 2-bromophenyl-acetic and ibuprofen ethyl esters, due to the presence of the naphthalen group. As a consequence, the rate of hydrolysis of the preferred (*S*) enantiomer by wild-type Lip2p is 4 times lower than the one observed for (*S*) ibuprofen ethyl ester (Table 1). On the contrary, the (*R*) poorly-hydrolyzed enantiomer is slightly better recognized, leading to an enantioselectivity 5 times lower ( $E=11$ ).

The rate of hydrolysis of the (*S*) enantiomer of ethyl ketoprofen by wild-type Lip2p is 4 times lower than the one observed for the (*S*) naproxen ethyl ester, 16 times compared to the (*S*) ibuprofen ethyl ester. Surprisingly, the (*R*) enantiomer of ethyl ketoprofen is the best recognized enantiomer by Lip2p ( $E=1.5$ ). Moreover, the catalytic efficiency of Lip2p for the best recognized enantiomer of ibuprofen, naproxen and ketoprofen ethyl ester is one order of magnitude higher than the one obtained with CRL1. Only CRL4, during the ethyl ketoprofen ester resolution, possesses a catalytic efficiency in the same range than the one observed with Lip2p.

## 2.2 Resolution of (*R, S*) ibuprofen ethyl ester racemate by Lip2p enzyme variants

With the aim of improving the enantioselectivity of the Lip2p lipase from *Y. lipolytica* for the resolution of the (*R, S*) ibuprofen ethyl ester racemate, a previously built library of enzyme variants<sup>54,55</sup> was screened. This library of single enzyme variants results from a rational engineering strategy that consisted in applying site-directed mutagenesis to 5 amino acid residues (T88, V94, V285, V232 and D97) located in the substrate binding site. Among these Lip2p variants, position 232 was found crucial for both activity and enantioselectivity during resolution of 2-bromophenyl acetic acid esters<sup>54</sup>. In total, 25 single enzyme variants of Lip2p were tested for their ability to resolve the ibuprofen ethyl ester racemate (19 single variants at position 232 and enzyme variants D97A, T88S, V94A, V94L, V285A, and V285L). A double substituted enzyme variant (D97A-V232F), with highly inverted enantioselectivity towards 2-bromo phenyl acetic acid esters was also tested<sup>55</sup>. It was checked by SDS page gel protein that all the variants tested are expressed at the same level than the wild-type enzyme (data not shown).

Enzyme variant at position T88 and V94 present lower activity than the wild-type Lip2p and no change in selectivity. Enzyme variant V285A presents a similar behavior as the wild-type enzyme, whereas V285L and D97A variants are no more active. The double substituted

enzyme variant D97A-V232F was not active on ethyl ibuprofen, whereas it displayed a total preference for the (*R*) enantiomer of 2-bromophenyl-acetic octyl ester and 4.5 times enhancement of its activity<sup>55</sup>.

As already observed during the kinetic resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters, position 232 appears crucial for the discrimination between ibuprofen enantiomers. Indeed, three Lip2p variants with an amino acid change at this position 232 (V232A, V232C and V232S) present a higher enantioselectivity than the wild-type enzyme. For all of them, improvement in enantioselectivity, from an *E* of 52 for the wild-type enzyme to an *E* higher than 200 for the enzyme variants, is due both to a better hydrolysis of the preferred (*S*) enantiomer (2.2 to 2.6 times higher) concomitant to a lower hydrolysis of the poorly recognized (*R*) enantiomer (Table 2). Enzyme variants V232A and V232C are no more able to recognize the (*R*) enantiomer, whereas enzyme variant V232S exhibits only a lower recognition of the poorly recognized (*R*) enantiomer (2.3 times lower than wild-type Lip2p). In addition to the gain in enantioselectivity, a remarkable increase in velocity was observed for the three variants (2.2-2.6 increase). The best enzyme was the enzyme variant V232A ( $E \gg 300$  with an initial rate of hydrolysis of the (*S*) enantiomer of  $4.1 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ).

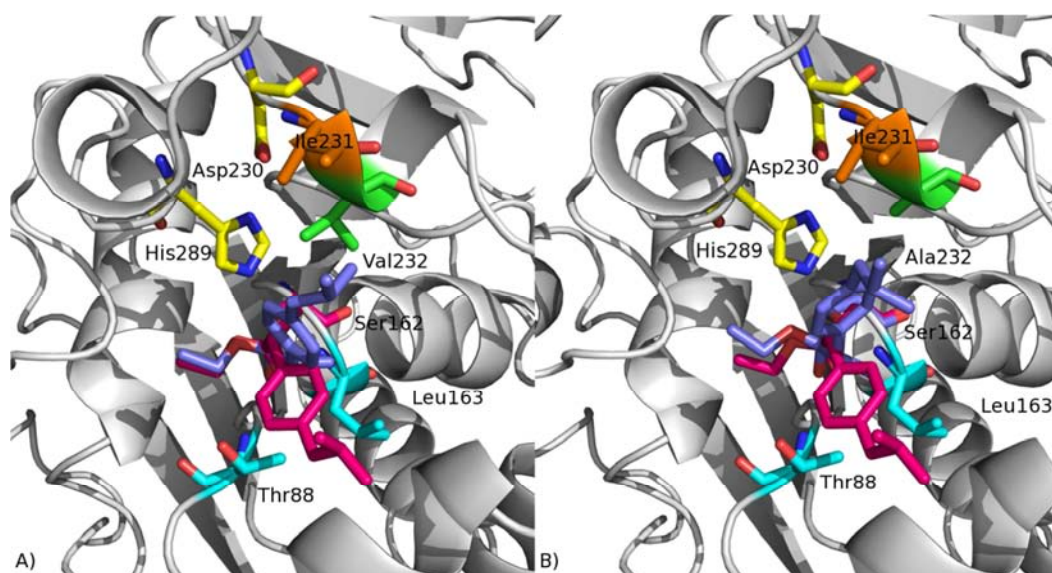
**Table 2.** Comparison of activity and selectivity of wild-type Lip2p lipase from *Y. lipolytica* and its variants during hydrolysis of (*R*, *S*) ibuprofen ethyl ester racemate. The hydrolysis was performed in a biphasic medium: 750  $\mu\text{L}$  of decane containing 50 mM of ester racemate, 750  $\mu\text{L}$  of enzyme supernatant (or the concentrate supernatant for CRL lipases), stirred at room temperature for 100 h.

	<b>viS</b> ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	<b>viR</b> ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	<b>E</b> (viS/viR)
Wild-type V232	1.56	0.030	52
V232A	4.07	0	>300
V232C	3.55	0	>300
V232S	3.44	0.013	263

During resolution of 2-bromo-phenyl-acetic octyl esters by Lip2p lipases, the best enzyme variant was found to be the V232S enzyme variant<sup>54</sup>, with an  $E \gg 200$ .

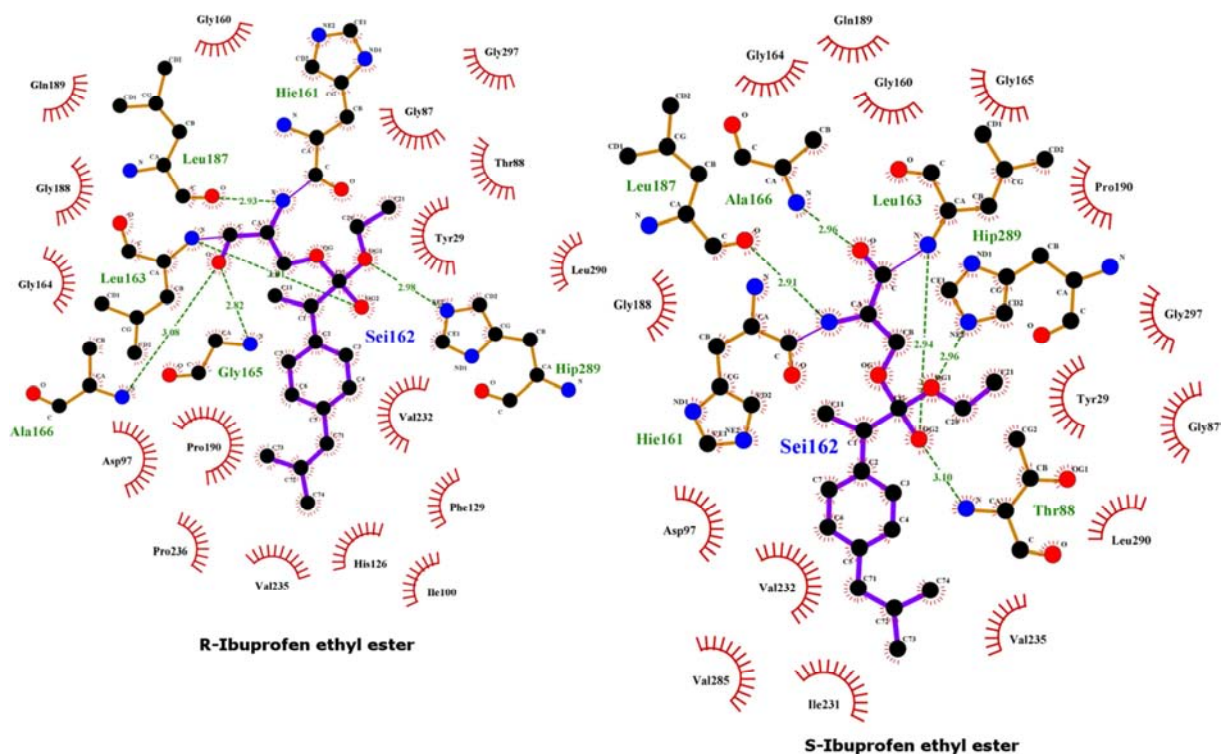
From molecular docking studies, it was assumed that the bulky bromine atom, facing V232 for the (*S*) enantiomer, was involved in the discrimination of the enantiomers. The size of this amino acid thus appeared to be crucial for the enantioselectivity. It is noticeable that ibuprofen and 2-bromophenyl-acetic esters are rather similar in structure. The bromine atom present at the  $\alpha$  position of the carboxylic acid in 2-bromophenyl-acetic ester is here replaced by a methyl group which presents similar steric hindrance. From our results, it appears clearly that the size of the amino acid at position 232 is more important than its polarity. Substitution

of the valine present in the wild-type Lip2p lipase by smaller amino acid residues such as A, C or S enables a better recognition of the (*S*) enantiomer and a poorer recognition of the (*R*) enantiomer. However, enzyme variant V232G is no more active on ethyl ibuprofen whereas it was found more efficient and selective during hydrolysis of 2-bromophenyl-acetic octyl esters<sup>54</sup>. As already observed with 2-bromophenyl-acetic octyl ester, performance of the enzyme variant V232T is similar to that of the wild-type enzyme. Despite low catalytic efficiency, enzyme variants V232L, V232I, V232F exhibited enantioselectivity inversion during 2-bromophenyl-acetic octyl ester resolution<sup>54</sup>. Replacement of the valine by a bulkier amino acid such as L, I and F led to enzyme inactivation in the kinetic resolution of ibuprofen. Using molecular modelling techniques, we constructed three-dimensional models of the covalent intermediates of Lip2p with (*R*, *S*) enantiomers of ibuprofen ethyl ester (Figure 2).



**Figure 2.** Representation of (*R*), (*S*) ibuprofen ethyl ester enantiomers covalently bound to catalytic S162 of wild-type lip2p (A) and V232A enzyme variant (B). The (*S*) (blue) and (*R*) (magenta) enantiomers are shown. The catalytic triad (D230, S162, H289) is shown as yellow sticks, residues forming the oxyanion hole (L163 and T88) are colored in cyan, amino acid residue at position 232 is colored in green, and I231 in orange. For clarity, hydrogens are not represented.

Docking studies revealed distinct binding conformations for the (*R*, *S*) enantiomers, which differed in the orientation of the aromatic ring, thus impacting the formation of hydrogen bonding interactions between ibuprofen ethyl ester and the oxyanion hole defined by L163 and T88. Only one hydrogen bond was found between the (*R*) enantiomer of ibuprofen ethyl ester and oxyanion residues of wild-type Lip2p, whereas two hydrogen bonds were observed for the (*S*) enantiomer (Figure 3).



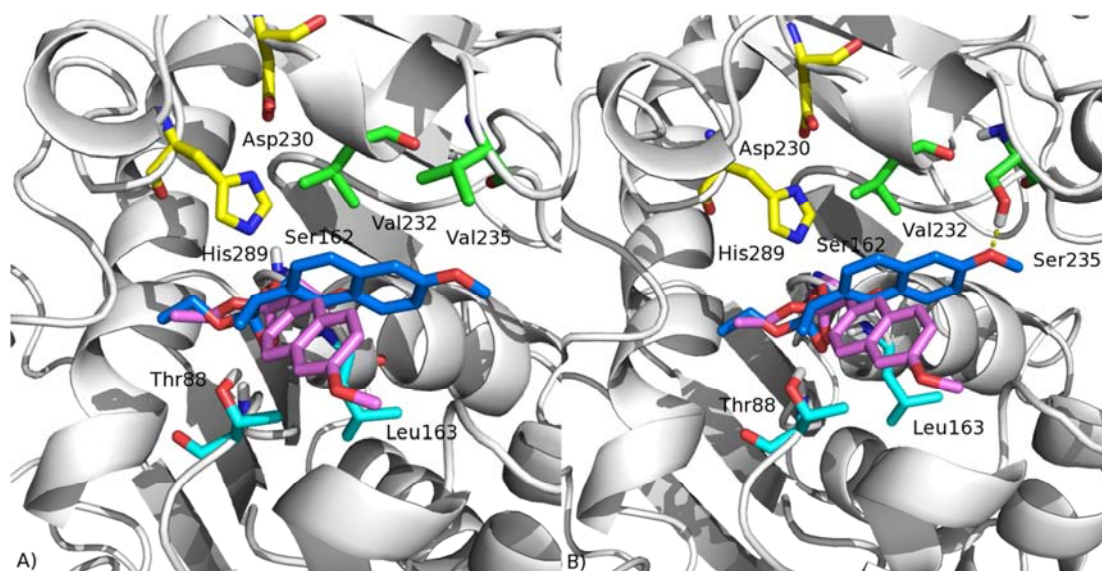
**Figure 3.** Representation of interactions between (*R*) or (*S*) ibuprofen ethyl ester with wild-type Lip2p enzyme. The drawing has been performed using Ligplot.

This could provide some explanations regarding the (*S*) enantioselectivity of wild-type Lip2p toward kinetic resolution of the ibuprofen ethyl ester. Mutation of V232 by smaller amino acid residues such as alanine, cysteine or serine, provides more space to better accommodate the (*S*) enantiomer of ibuprofen ethyl ester in the catalytic site (Figure 2B), with a slight reorientation of the aromatic ring that favors formation of i) hydrogen bonding interactions between residues from the oxyanion hole and the carbonyl group from the ethyl ester (Figure 3), and ii) additional van der Waals interactions between I231 and the isobutyl group. Conversely, mutation of V232 did not alter binding mode of the (*R*) enantiomer in comparison with that observed in wild-type enzyme.

### 2.3 Resolution of (*R*, *S*) naproxen ethyl ester racemate by Lip2p enzyme variants

The same strategy used for the resolution of ibuprofen ethyl ester racemate was applied for the resolution of naproxen ethyl ester racemate. The same library of 25 enzyme variants of Lip2p lipase from *Y. lipolytica* was tested. As previously observed for ibuprofen, an amino acid change at positions 88, 94, 97 and 285 had either neutral or detrimental effect on enzyme activity and selectivity. Changing V232 by smaller amino acid residues such as A, C or S did not improve neither activity nor selectivity of the enzyme. Hydrolysis rate of the preferred (*S*) enantiomer was even lower than that of the wild-type Lip2p lipase (data not shown). If a bulkier amino acid residue, such as a L, I or F, is introduced at this position, activity is completely lost. To resume, no improvement, neither in activity nor in enantioselectivity, was obtained using this library of enzyme variants.

In order to provide structural insight to improve selectivity and activity of Lip2p lipase toward the resolution of naproxen ethyl ester racemate, a molecular modelling study was undertaken. The energy-minimized covalent intermediates of Lip2p with (*R*, *S*) enantiomers of naproxen ethyl ester were built. Molecular docking was carried out to explore accessible conformational space of both enantiomers in the active site pocket. The top scoring poses identified for each enantiomer were then compared (Figure 4A). The binding mode of the (*R*) enantiomer of naproxen ethyl ester was found close to that observed for the (*R*) ibuprofen ethyl ester. Conversely, the binding mode of the (*S*) enantiomer was found significantly different from that observed for ibuprofen ethyl ester. In this case, the bulkier naphthalen moiety is binding in a small pocket near V235. It appears thus that introduction of an amino acid mutation at this position could help to further improve the selective recognition of the (*S*) enantiomer.



**Figure 4.** Representation of (*R*), (*S*) naproxen ethyl ester enantiomers covalently bound to catalytic S162 of A) wild-type lip2p and B) Lip2p V235S variant. The (*S*) (blue) and (*R*) (magenta) enantiomers are shown; The catalytic triad is shown in yellow, residues forming the oxyanion hole are colored in cyan and residues 232 and 235 are colored in green. For clarity, hydrogens are not represented.

On the basis of this computational study, position 235 was mutated by all 19 possible amino acids. It was checked by SDS PAGE that all the variants tested are expressed at the same level than the wild-type enzyme (data not shown).

This position 235 was found crucial for activity and enantioselectivity of the enzyme during the naproxen ethyl esters hydrolysis (Table 3). Indeed, eight enzyme variants presented both an increase in activity and enantioselectivity.

**Table 3.** Comparison of activity and selectivity of wild-type Lip2p and the best enzyme variants on position V235 during hydrolysis of (*R*, *S*) naproxen ethyl ester racemate. The hydrolysis was performed in a biphasic medium: 750  $\mu\text{L}$  of decane containing 50 mM of ester racemate, 750  $\mu\text{L}$  of enzyme supernatant (or the concentrate supernatant for CRL lipases), stirred at room temperature for 100 h.

	ViS ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	ViR ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	E (viS/viR)
Wild-type V235	0.42	0.04	11
V235A	1.10	0.004	274
V235C	1.09	0	>300
V235E	1.31	0.02	60
V235L	2.72	0.14	19
V235M	0.75	0	>300
V235N	1.01	0.02	67
V235S	1.12	0	>300
V235T	0.71	0	>300

Enantioselectivity was shown to increase as the result of a concomitant increase in the hydrolysis rate of the preferred (*S*) enantiomer and a decrease in the hydrolysis rate of the

poorly-recognized (*R*) enantiomer. One enzyme variant, namely V235L, exhibited a spectacular increase for the hydrolysis rate of the (*S*) enantiomer (6.5 times higher than the activity of the wild-type enzyme). Nevertheless, as its initial rate of hydrolysis of the (*R*) enantiomer was also higher, the resulting *E* is only twice the *E* of wild-type Lip2p lipase. Enzyme variants V235C, V235M, V235S and V235T are no more able to recognize the (*R*) enantiomer, leading to an  $E \gg 300$ . The two best enzyme variants isolated are V235C and V235S, which exhibit a 2.7 times increase in activity for the best recognized (*S*) enantiomer and an *E* higher than 200.

Moreover, to confirm that the (*R*) enantiomer of the naproxen is absolutely not hydrolyzed by the Lip2p V235S variant, a first hydrolysis of the racemic mixture was conducted with this variant and the organic phase was recovered after 60 h reaction. This organic phase almost only composed of the (*R*) enantiomer of the naproxen was put in contact with fresh enzyme (Lip2p V235S). No hydrolysis of the (*R*) enantiomer was observed over a period of 50 hours. Detailed analysis of molecular modelling results indicated that substitution of V235 by a small and polar amino acid residue such as serine, threonine or cysteine, favors the formation of an additional hydrogen bonding interaction between the amino acid side chain at position 235 and the oxygen of the methoxy group from the (*S*) enantiomer (Figure 4B), leading to an increase of the affinity for the (*S*) enantiomer over the (*R*) and thus an enhanced enantioselectivity, as confirmed by experimental data.

The enzyme variants at the position V235 were tested for the resolution of ethyl ibuprofen; these enzyme variants have a low activity compared to the wild type Lip2p. For example, the enzyme variant V235S and V235C are 7- and 15 times less active than the wild type enzyme, respectively.

#### 2.4 Resolution of (*R*, *S*) ketoprofen ethyl ester racemate by Lip2p enzyme variants

The two combined libraries used previously were tested.

Enzyme variant T88S, V285A and enzyme variants at position V94A present lower activity than the wild-type Lip2p and no change in selectivity. Enzyme variant V285L, D97A are no more active.

The two positions V232 and V235, were found crucial for the activity and enantioselectivity of the enzyme toward ethyl ketoprofen (Table 4). Substitution of the valine in position 232 present in the wild-type Lip2p by a smaller amino acid residue such as S (and to a lesser

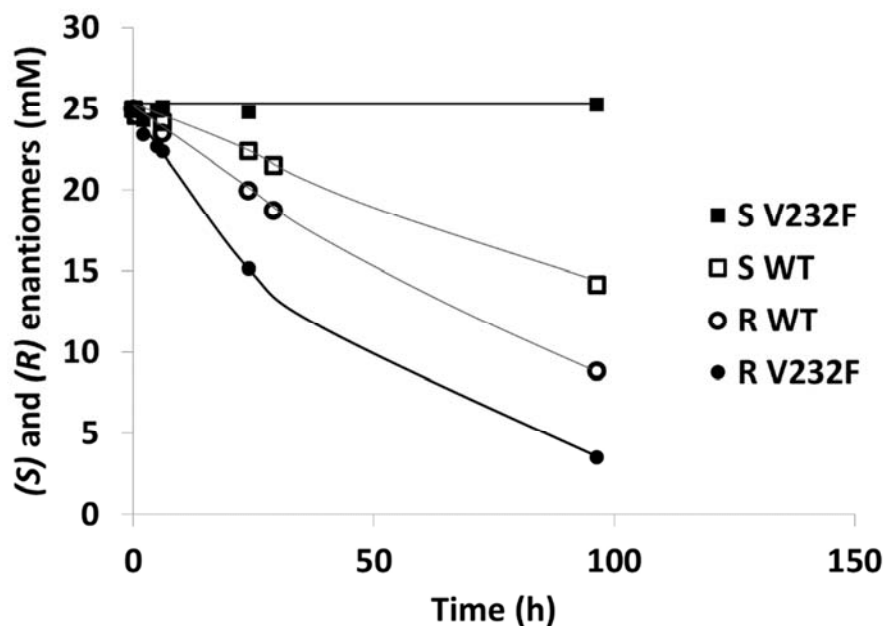


extent A) enables a better recognition of the (*S*) enantiomer (6 times) and a poorer recognition of the (*R*) enantiomer (3 times), resulting in an inversion of preferred enantiomer. The single enzyme variant V235A and mainly V235G present the same behavior with an inversion of the preferred enantiomer and a medium enantioselectivity. Nevertheless, activity of the V235G variant is twice higher than the one obtained with variant V232S. The double enzyme variant V232S-V235G was constructed but the kinetics and enantioselectivity became lower than the wild-type lipase.

Regarding the enantioselective hydrolysis of ketoprofen ethyl ester, the best enzyme was the enzyme variant V232F ( $E \gg 300$  with an initial rate of hydrolysis of the (*R*) enantiomer of  $0.4 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ). As observed during the 2-bromo-arylacetic acid ester resolution, a substitution of valine 232 by a bulky F annihilates the conversion of the (*S*) enantiomer whereas the recognition for the (*R*) enantiomer increases (table 4 and figure 5). The double mutation D97A-V232F was interesting in the case of the resolution of the 2-bromo-arylacetic acid ester<sup>61</sup> but in this case the double mutation is useless, the monoenzyme variant V232F present the same enantioselectivity and the kinetic is slightly higher for the monoenzyme variant (Table 4).

**Table 4.** Comparison of activity and selectivity of wild-type Lip2p lipase from *Y. lipolytica* and its variants during hydrolysis of (*R*, *S*) ketoprofen ethyl ester racemate. The hydrolysis was performed in a biphasic medium: 750  $\mu\text{L}$  of decane containing 50 mM of ester racemate, 750  $\mu\text{L}$  of enzyme supernatant (or the concentrate supernatant for CRL lipases), stirred at room temperature for 100 h.

	viS ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	viR ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	E (viS/viR) or (viR/ viS)	
Wild-type	0.11	0.16	1.5	( <i>R</i> )
V232A	0.11	0.04	2.91	( <i>S</i> )
V232F	0	0.40	>300	( <i>R</i> )
V232S	0.7	0.05	14	( <i>S</i> )
V235A	1.6	0.13	12	( <i>S</i> )
V235G	1.17	0.07	16	( <i>S</i> )
D97A-V232F	0	0.36	>300	( <i>R</i> )



**Figure 5.** Hydrolysis kinetics of (*R*, *S*) ketoprofen ethyl ester in a biphasic medium (water:decane, 50:50, v/v) at ambient temperature. Wild-type lipase activity towards (*S*) and (*R*) enantiomers and variant V232F lipase activity towards (*S*) and (*R*) enantiomers. The hydrolysis was performed in a biphasic medium: 750  $\mu$ L of decane containing 50 mM of ester racemate, 750  $\mu$ L of enzyme supernatant (or the concentrate supernatant for CRL lipases), stirred at room temperature for 100 h.

### 3. Conclusion

The objective of this paper was to identify new enzymes for the kinetic resolution of ibuprofen, naproxen and ketoprofen racemates, three molecules of interest for the pharmaceutical industry. Up to now, only lipases from *Candida rugosa* had been reported efficient for this purpose if we exclude solvent and surfactant use. However, if their enantioselectivity is high, their catalytic efficiency remains very low. In this work, the lipase Lip2p, efficiently extracellularly produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*, was shown to have reasonable selectivity and one order of magnitude higher activity than the lipase CRL1 from *C. rugosa* during hydrolysis of ibuprofen, naproxen and ketoprofen ethyl esters. Enantioselectivity of this lipase was improved by site-directed mutagenesis experiments targeted to the substrate binding site, guided by molecular modelling based on the molecular docking of the (*R*) and (*S*) enantiomers of substrates in the active site. The nature of amino acids at positions 232 and 235, localized in the hydrophobic substrate binding site, were identified as being crucial for the enantioselectivity of the resolution of these three racemates. The enantioselectivity of Lip2p towards ethyl ibuprofen was increased from 52 for the wild-type enzyme to an enantioselectivity higher than 300 for the variants V232A and V232C.

Mutations of V235 to C, M, S, or T lead to a tremendous increase in enantioselectivity, from 11 to an  $E \gg 300$  for the resolution of naproxen ethyl ester racemate. One variant of a lipase from *Yarrowia lipolytica* with an infinite enantioselectivity was found (V232F) with an (*R*) enantioselectivity for the resolution of ethyl ketoprofen ester racemate, while the wild-type lipase had a poor enantioselectivity 1.5. In addition to the gain in selectivity, a remarkable increase in velocity was demonstrated (at least 2.5 times increase) for all substrates.

These results demonstrate the high potential of rational engineering to create new biocatalysts with enhanced activity and selectivity, suitable for industrial applications.

#### 4. Experimental / Materials and methods

##### 4.1 Materials and chemicals

Peptone, tryptone, and yeast extract were purchased from Difco (Paris, France), oleic acid from Prolabo (Fontenay sous Bois, France). Racemic ibuprofen, racemic ketoprofen, (*S*) naproxen and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

##### 4.2 Racemization of (*S*) naproxen

The protocol used for the racemization of the (*S*) naproxen was described in earlier studies<sup>31,32</sup>.

##### 4.3 Synthesis of ibuprofen, naproxen and ketoprofen ethyl ester

2.5 g of racemic ibuprofen, naproxen or ketoprofen were mixed with 100 mL ethanol and 1 mL of sulfuric acid. The mixture was stirred at 65 °C for the night. Then 2.5 g of calcium carbonate were added and the mixture was stirred again for 30 minutes. The precipitate was removed by filtration and the filtrate was dried under reduced pressure. The reaction was followed by Thin Layer Chromatography analysis (TLC) using hexane/isopropanol (99/1 v/v) as the eluent. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker AC-200.1 (200.1 MHz) spectrometer and confirmed the purity of both esters.

#### 4.4 Construction of Lip2p variants by site-directed mutagenesis and *C. rugosa* lipase in a recombinant strain

Variants at position 88, 94, 97, 232 and 285 were previously constructed<sup>54</sup> and only construction of variants targeting position 235 was performed in the current work. JMP8 plasmid carrying the wild-type LIP2 gene was previously described<sup>58</sup>: LIP2 encoding the extracellular lipase Lip2p is under the transcriptional control of the strong promoter POX2 inducible by oleic acid also previously described<sup>54</sup>. Mutagenesis in the LIP2 gene was performed using the QuikChange<sup>TM</sup> site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The following primers and their complementary reverse counterpart were used for systematic directed mutagenesis at position 235: 5'-CGTCCCTCAAXXXCCCTTCTGGG-3' with XXX being GCC for V235A, TGC for V235C, GAC for V235D, GAG for V235E, TTC for V235F, GGC for V235G, CAC for V235H, ATC for V235I, AAG for V235K, CTC for V235L, ATG for V235M, AAC for V235N, CCC for V235P, CAG for V235Q, CGA for V235R, TCC for V235S, ACC for V235T, TGG for V235W, TAC for V235Y. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was used as the host to produce the different plasmids and sequences were controlled by sequencing (GATC, Konstanz, Germany). Plasmids were digested by *NotI* and used for the transformation of strain *Y. lipolytica* JMY1212<sup>56</sup> by the lithium acetate method as described previously<sup>62</sup>.

Construction of *C. rugosa* lipase in a recombinant strain JMY1212 of *Y. lipolytica* CRL1 and CRL4 was previously described<sup>51</sup>.

#### 4.5 Production and activity of lipases

The production of lipases is described elsewhere<sup>61</sup>. In order to increase the activity, the obtained lipase can be concentrated using centrifugal filter units (Amicon<sup>®</sup> Ultra Centrifugal Filters, Merck Millipore).

#### 4.6 Enzymatic hydrolysis of ibuprofen, naproxen and ketoprofen ethyl esters

In a 2 mL reactor (Eppendorf), 750  $\mu$ L of culture supernatant (or the concentrate supernatant) containing the enzyme and 750  $\mu$ L of racemic ethyl ibuprofen, naproxen or ketoprofen (50 mM in decane) were added. Reactors were stirred in a vortex Genie 2 (D. Dutscher, Brumat, France) at room temperature for 100 h. At regular time intervals, the progress of the reaction was monitored by analyzing the organic phase composition after phase separation by

centrifugation (dilution 1 and 10 in hexane for the ibuprofen and naproxen ester, respectively).

#### 4.7 Chromatography analysis

The HPLC device was equipped with a chiral column: Chiralcel OJ-H (25 cm x 4.6 mm) (Chiral technologies Europe, Daicel group) connected to a UV detector (at 254 nm for the analysis of ibuprofen ethyl ester and 270 nm for the naproxen ethyl ester). A flow rate of 1.0 mL/min was used. The mobile phase was composed of a mixture n-hexane/isopropanol [98:2 v/v] for ibuprofen and naproxen ethyl ester analysis. Retention time: 4/4.5 mn for the (*R*, *S*) enantiomers of ibuprofen ethyl ester and 20/22 mn for the (*R*, *S*) enantiomers of naproxen ethyl ester. Ibuprofen formed during the reaction and remaining in the decane phase can be analyzed in the same conditions as ibuprofen ethyl ester, the retention time being 7/8 mn for the (*R*, *S*) enantiomers of ibuprofen, respectively.

For the analysis of ketoprofen ethyl ester the mobile phase was composed only of hexane, with retention times 12 and 13 mn for the (*S*) and (*R*) enantiomer respectively.

#### 4.8 Determination of enantioselectivity (E)

$$E = \frac{v_{iS}}{v_{iR}}$$

o r

$$E = \frac{v_{iR}}{v_{iS}}$$

Where  $v_{iS}$  and  $R$  are the initial rates of hydrolysis of the enantiomer (*S*) and (*R*) respectively.

#### 4.9 Molecular modelling studies

As the only available crystallographic structure of *Y. lipolytica* Lip2p corresponds to a closed inactive conformation of the enzyme<sup>63</sup>, we used an homology model of the open conformation<sup>54</sup> to perform docking of the ligands in the catalytic site. Three-dimensional models of the covalent tetrahedral intermediates for each enantiomer (*R*, *S*) of ibuprofen and naproxen ethyl esters, respectively, were built. Each enantiomer was placed in the active site so that it is covalently bound to the catalytic serine (S162) and fulfills the hydrogen bonding interactions required for productive catalysis. Models of enzyme variants mutated at positions 232 or 235 were constructed from the model of wild type Lip2p by introducing site mutations

using the mutator module in VMD<sup>64</sup>. Each enzyme variant was then minimized using parm99sb-ildn force field<sup>65</sup> in Gromacs software<sup>66</sup>. The covalent docking of the enantiomers was carried out using Autodock program<sup>67</sup>. The conformational space explored during docking was defined by a grid centered on S162 sidechain and spacing by 0.375 Å. Autodock parameters were set to the standard values for genetic algorithm and 200 docking poses were extracted. These poses were clustered based on their RMSD. One ligand conformation representative of the best cluster was placed in wild-type Lip2p or its enzyme variants and the whole system was minimized until the maximum force was less than 100 kJ.mol<sup>-1</sup>. Visualization and graphics were done using VMD software<sup>64</sup>.

### Acknowledgments

We thank the Pôles de Recherche et d'Enseignement Supérieur de l'Université de Toulouse and the Région Midi-Pyrénées, France for PhD grant of Doriane Gerard. We also thank the ICEO facility, which is part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBISA), for access to the analytical chromatography platform.

### References

1. Sheldon R A. Chirotechnology: Designing economic chiral syntheses. *J Chem Technol Biotechnol.* 1996;67(1):1-14.
2. Adams SS, Bresloff P, Mason CG. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer. *J Pharm Pharmacol.* 1976;28(3):256-257.
3. Hutt AJ, Caldwell J. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1984;9(4):371-373.
4. Battistel E, Bianchi D, Cesti P, Pina C. Enzymatic resolution of (*S*)-(+)-Naproxen in a continuous reactor. *Biotechnol Bioeng.* 1991;38:659-664.
5. Midha KK, Mckay G, Rawson MJ, Hubbard JW. The impact of stereoisomerism in bioequivalence studies. *J Pharm Sci.* 1998;87(7):797-802.
6. Kourist R, Domínguez de María P, Miyamoto K. Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of profens – recent trends and developments. *Green Chem.* 2011;13(10):2607.
7. Könst P, Merckens H, Kara S, et al. Enantioselective oxidation of aldehydes catalyzed by alcohol dehydrogenase. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(39):9914-9917.
8. Friest J a., Maezato Y, Broussy S, Blum P, Berkowitz DB. Use of a robust dehydrogenase from an archaeal hyperthermophile in asymmetric catalysis-dynamic reductive kinetic resolution entry into (*S*)-profens. *J Am Chem Soc.* 2010;132(17):5930-5931.
9. Galletti P, Emer E, Gucciardo G, Quintavalla A, Pori M, Giacomini D. Chemoenzymatic synthesis of (2*S*)-2-arylpropanols through a dynamic kinetic resolution of 2-arylpropanals with alcohol dehydrogenases. *Org Biomol Chem.* 2010;8(18):4117-4123.

10. Giacomini D, Galletti P, Quintavalla A, Gucciardo G, Paradisi F. Highly efficient asymmetric reduction of arylpropionic aldehydes by horse liver alcohol dehydrogenase through dynamic kinetic resolution. *Chem Commun (Camb)*. 2007;(39):4038-4040.
11. Pietruszka J, Schölzel M. Ene reductase-catalysed synthesis of (*R*)-profen derivatives. *Adv Synth Catal*. 2012;354(4):751-756.
12. Habibi Z, Mohammadi M, Yousefi M. Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. *Process Biochem*. 2013;48(4):669-676.
13. Ng IS, Tsai SW. Investigation of lipases from various *Carica papaya* varieties for hydrolysis of olive oil and kinetic resolution of (*R,S*)-profen 2,2,2-trifluoroethyl thioesters. *Process Biochem*. 2006;41:540-546.
14. Qin B, Liang P, Jia X, et al. Directed evolution of *Candida antarctica* lipase B for kinetic resolution of profen esters. *Catal Commun*. 2013;38:1-5.
15. Sandström AG, Wikmark Y, Engström K, Nyhlén J, Bäckvall J-E. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(1):78-83.
16. Lee WH, Kim K-J, Kim MG, Lee SB. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: Effects of organic cosolvents and temperature. *J Ferment Bioeng*. 1995;80(6):613-615.
17. Chang CS, Tsai SW, Lin CN. Enzymatic resolution of (*RS*)-2-arylpropionic acid thioesters by *Candida rugosa* lipase-catalyzed thiotransesterification or hydrolysis in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry*. 1998;9:2799-2807.
18. Kim MG, Lee EG, Chung BH. Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment. *Process Biochem*. 2000;35(9):977-982.
19. Manetti F, Mileto D, Corelli F, et al. Design and realization of a tailor-made enzyme to modify the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* lipase. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 2000;1543(1):146-158.
20. Bhatia S, Long WS, Kamaruddin AH. Enzymatic membrane reactor for the kinetic resolution of racemic ibuprofen ester: Modeling and experimental studies. *Chem Eng Sci*. 2004;59:5061-5068.
21. Long WS, Kow PC, Kamaruddin AH, Bhatia S. Comparison of kinetic resolution between two racemic ibuprofen esters in an enzymic membrane reactor. *Process Biochem*. 2005;40(7):2417-2425.
22. Fazlena H, Kamaruddin a. H, Zulkali MMD. Dynamic kinetic resolution: Alternative approach in optimizing *S*-ibuprofen production. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2006;28(4):227-233.
23. Won K, Hong JK, Kim KJ, Moon SJ. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic ibuprofen coupled with pervaporation. *Process Biochem*. 2006;41:264-269.
24. Marszałł MP, Siódmiak T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto magnetic beads for kinetic resolution of (*R,S*)-ibuprofen. *Catal Commun*. 2012;24:80-84.
25. Siódmiak T, Ziegler-Borowska M, Marszałł MP. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (*R,S*)-ibuprofen. *J Mol Catal B Enzym*. 2013;94:7-14.
26. Yousefi M, Mohammadi M, Habibi Z. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *J Mol Catal B Enzym*. 2014;104:87-94.
27. Tsai S-W, Wei H-J. Kinetics of Enantioselective Esterification of Naproxen by Lipase in Organic Solvents. *Biocatal Biotransformation*. 1994;11:33-45.

28. López N, Pernas M a., Pastrana LM, Sánchez A, Valero F, Rúa ML. Reactivity of Pure *Candida rugosa* Lipase Isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in Aqueous and Organic Media. Influence of the Isoenzymatic Profile on the Lipase Performance in Organic Media. *Biotechnol Prog.* 2004;20(1):65-73.
29. Botta M, Cernia E, Corelli F, Manetti F, Soro S. Probing the substrate specificity for lipases. II. Kinetic and modeling studies on the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol.* 1997;1337(2):302-310.
30. Xin JY, Li S Ben, Chen XH, Wang LL, Xu Y. Improvement of the enantioselectivity of lipase-catalyzed naproxen ester hydrolysis in organic solvent. *Enzyme Microb Technol.* 2000;26:137-141.
31. Wu JY, Liu SW. Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: Under controlled water activity. *Enzyme Microb Technol.* 2000;26:124-130.
32. Steenkamp L, Brady D. Screening of commercial enzymes for the enantioselective hydrolysis of *R,S*-naproxen ester. *Enzyme Microb Technol.* 2003;32:472-477.
33. Chen CC, Tsai SW, Villeneuve P. Enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl ester in water-saturated solvents via lipases from *Carica pentagona* Heilborn and *Carica papaya*. *J Mol Catal B Enzym.* 2005;34:51-57.
34. Xin JY, Zhao YJ, Shi YG, Xia CG, Li S Ben. Lipase-catalyzed naproxen methyl ester hydrolysis in water-saturated ionic liquid: Significantly enhanced enantioselectivity and stability. *World J Microbiol Biotechnol.* 2005;21(2):193-199.
35. Chang CS, Tsai S-W. A facile enzymatic process for the preparation of (*S*) Naproxen ester prodrug in organic solvents. *Enzyme Microb Technol.* 1997;20:635-639.
36. Sehgal AC, Kelly RM. Strategic Selection of Hyperthermophilic Esterases for Resolution of 2-Arylpropionic Esters. *Biotechnol Prog.* 2003;19(5):1410-1416.
37. Steenkamp L, Brady D. Optimisation of stabilised Carboxylesterase NP for enantioselective hydrolysis of naproxen methyl ester. *Process Biochem.* 2008;43:1419-1426.
38. Wei T, Feng S, Mao D, Yu X, Du C, Wang X. Characterization of a new thermophilic and acid tolerant esterase from *Thermotoga maritima* capable of hydrolytic resolution of racemic ketoprofen ethyl ester. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;85-86:23-30.
39. Carvalho PDO, Contesini FJ, Ikegaki M. Enzymatic resolution of (*R,S*)-ibuprofen and (*R,S*)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources. *Brazilian J Microbiol.* 2006;37(3):329-337.
40. Zhang W-W, Jia J-Q, Wang N, Hu C-L, Yang S-Y, Yu X-Q. Improved activity of lipase immobilized in microemulsion-based organogels for (*R, S*)-ketoprofen ester resolution: Long-term stability and reusability. *Biotechnol Reports.* 2015.
41. Park HJ, Choi WJ, Huh EC, Lee EY, Choi CY. Production of optically active ketoprofen by direct enzymatic esterification. *J Biosci Bioeng.* 1999;87(4):545-547.
42. Zhang YY, Liu JH. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (*R, S*)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochem Eng J.* 2011;54(1):40-46.
43. Ni Z, Zhou P, Jin X, Lin XF. Integrating In Silico and In vitro Approaches to Dissect the Stereoselectivity of *Bacillus subtilis* Lipase A toward Ketoprofen Vinyl Ester. *Chem Biol Drug Des.* 2011;78(2):301-308.



44. Xi WW, Xu JH. Preparation of enantiopure (*S*)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. *Process Biochem.* 2005;40(6):2161-2166.
45. Zhu S, Wu Y, Yu Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on a pH-sensitive support for enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J Biotechnol.* 2005;117(1):397-401.
46. Liu YY, Xu JH, Wu HY, Shen D. Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen. *J Biotechnol.* 2004;110(2):209-217.
47. Long Z, Xu J, Zhao L, Pan J, Yang S, Hua L. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. 2007;47:105-110.
48. Kim GJ, Lee EG, Gokul B, et al. Identification, molecular cloning and expression of a new esterase from *Pseudomonas* sp. KCTC 10122BP with enantioselectivity towards racemic ketoprofen ethyl ester. *J Mol Catal B Enzym.* 2003;22(1-2):29-35.
49. Lee KW, Bae HA, Shin GS, Lee YH. Purification and catalytic properties of novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* sp. ES-1 for hydrolysis of (*S*)-ketoprofen ethyl ester. *Enzyme Microb Technol.* 2006;38(3-4):443-448.
50. Yoon S, Kim S, Park S, et al. Improving the enantioselectivity of an esterase toward (*S*)-ketoprofen ethyl ester through protein engineering. *J Mol Catal B Enzym.* 2014;100:25-31.
51. Piamtongkam R, Duquesne S, Bordes F, et al. Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipases (Lip1, Lip3, and Lip4) towards 2-bromo phenylacetic acid octyl esters controlled by a single amino acid. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(8):1749-1756.
52. Cancino M, Bauchart P, Sandoval G, et al. A variant of *Yarrowia lipolytica* lipase with improved activity and enantioselectivity for resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2008;19:1608-1612.
53. Liu Y, Wang F, Tan T. Cyclic resolution of racemic ibuprofen via coupled efficient lipase and Acid-base catalysis. *Chirality.* 2009;22(10):929-935.
54. Bordes F, Cambon E, Dossat-Létisse V, et al. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site. *ChemBioChem.* 2009;10(10):1705-1713.
55. Cambon E, Piamtongkam R, Bordes F, et al. A new *Yarrowia lipolytica* expression system: An efficient tool for rapid and reliable kinetic analysis of improved enzymes. *Enzyme Microb Technol.* 2010;47(3):91-96.
56. Bordes F, Fudalej F, Dossat V, Nicaud J-M, Marty A. A new recombinant protein expression system for high-throughput screening in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods.* 2007;70(3):493-502.
57. Fickers P, Nicaud JM, Destain J, Thonart P. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;63(2):136-142.
58. Pignède G, Wang H, Fudalej F, et al. Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica* Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. 2000;182(10):2802-2810.
59. Nicaud JM, Madzak C, van den Broek P, et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 2002;2(3):371-379.
60. Guieysse D, Sandoval G, Faure L, Nicaud JM, Monsan P, Marty A. New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron Asymmetry.* 2004;15(22):3539-3543.

61. Cambon E, Piamtongkam R, Bordes F, Duquesne S, André I, Marty A. Rationally engineered double substituted variants of *Yarrowia Lipolytica* lipase with enhanced activity coupled with highly inverted enantioselectivity towards 2-bromo phenyl acetic acid esters. *Biotechnol Bioeng.* 2010;106(6):852-859.
62. Le Dall MT, Nicaud JM, Gaillardin C. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet.* 1994;26(1):38-44.
63. Bordes F, Barbe S, Escalier P, et al. Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biophys J.* 2010;99(7):2225-2234.
64. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD-Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14:33-38.
65. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2010;78(8):1950-1958.
66. Pronk S, Páll S, Schulz R, et al. GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics.* 2013;29(7):845-854.
67. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785-2791.



### 2.2.3. Conclusion de la publication

#### 2.2.3.1. Isoformes des lipases de *Candida rugosa*

Les isoformes des lipases de *C. rugosa* (CRL1 et CRL4) ont été testées pour la résolution de l'éthyl ibuprofène, l'éthyl naproxène et l'éthyl kétoprofène. La lipase CRL1 de *C. rugosa* présente de bons résultats du point de vue de l'énantiosélectivité ( $E > 200$ ) vis-à-vis de l'éthyl ibuprofène, l'éthyl naproxène et de l'éthyl kétoprofène mais avec une activité faible comparée à Lip2p de *Y. lipolytica*. La lipase CRL4, quant à elle, n'est pas active sur l'éthyl naproxène et l'éthyl ibuprofène mais est très active et énantiosélective ( $E > 200$ ) vis-à-vis de l'éthyl kétoprofène. De la même manière que ce qui avait été montré précédemment vis-à-vis de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique (Piamtongkam et al., 2011), CRL1 et CRL4 ont une énantio-préférence différente vis-à-vis de l'éthyl kétoprofène : CRL1 est (*S*) énantiosélective alors que CRL4 est (*R*) sélective.

#### 2.2.3.2. Résolution de l'éthyl ibuprofène

L'acide aminé principal qui permet de contrôler l'énantiosélectivité de Lip2p pour la résolution de l'éthyl ibuprofène est la valine 232. Il s'agit de la même position que pour l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique (Bordes et al., 2009), ce qui est cohérent étant donné les similitudes structurelles entre ce substrat et l'éthyl ibuprofène. Le mutant V232A augmente l'énantiosélectivité vis-à-vis de l'ibuprofène de 52 à  $> 200$  pour une vitesse initiale 2,6 fois supérieure.

Le mutant V232A sera donc utilisé pour la résolution de l'ibuprofène par la suite.

#### 2.2.3.3. Résolution de l'éthyl naproxène

La banque de mutants créée pour l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique n'a pas révélé d'enzyme remplissant le cahier des charges ( $E > 200$ ). La structure du naproxène est en effet éloignée de celle de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique ou de l'ibuprofène. Le naproxène, qui possède un groupe naphthalène, est stériquement beaucoup plus encombré et doit s'accommoder différemment dans le site actif.

Par amarrage moléculaire (molecular docking), qui a permis de visualiser le positionnement des deux énantiomères du naproxène dans le site actif de l'enzyme, le groupe de

modélisation moléculaire de l'équipe CIMES du LISBP, et tout particulièrement les Dr. Isabelle ANDRE et Marc GUEROULT, a déterminé que la position 235 pourrait être une cible intéressante pour améliorer l'énantiosélectivité de Lip2p de *Y. lipolytica* vis-à-vis du naproxène. Cette position est en effet proche du groupe naphthalène de l'énantiomère (*S*) de l'ester. Cinq mutants avec une (*S*) énantiosélectivité supérieure à 200 ont ainsi été obtenus (V235 A, C, M, S, T) contre une (*S*) énantiosélectivité de 10 pour la lipase sauvage. Le mutant V235S possède la meilleure vitesse de réaction  $1,1 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ . Sa vitesse est en effet multipliée par 2,6 par rapport à la lipase sauvage.

#### 2.2.3.4. Résolution de l'éthyl kétoprofène

Le mutant Lip2p V232F possède une énantiosélectivité  $>200$  pour la résolution de l'éthyl kétoprofène et vitesse initiale de conversion de l'énantiomère préféré de  $0,4 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ . Cette enzyme possède une énantio-préférence vis-à-vis de l'énantiomère (*R*) tout comme l'enzyme sauvage ce qui est une particularité car pour les trois autres substrats l'enzyme sauvage possède une énantio-préférence vis-à-vis de l'énantiomère (*S*). Trois mutants précédemment construits ont montré une (*S*) énantiosélectivité accrue d'un facteur 10 par rapport à l'enzyme sauvage (V232S, V235G, V235A).

Le paragraphe suivant présente des résultats complémentaires obtenus lors de la recherche d'enzymes énantiosélectives pour le naproxène et l'ibuprofène mais non inclus dans l'article.

#### 2.2.4. Annexe : Arrêt de la réaction

Les réactions d'hydrolyse de l'éthyl ibuprofène et de l'éthyl naproxène ne sont pas totales contrairement à l'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique ou de l'éthyl kétoprofène : il reste respectivement 12 % et 4 % de (*S*) éthyl ibuprofène et de (*S*) éthyl naproxène au bout de 40 et 100 h de réaction respectivement.

Les graphiques des Figures 25 et 26 présentent respectivement l'hydrolyse au cours du temps du (*R*, *S*) éthyl ibuprofène par Lip2p V232A et l'hydrolyse du (*R*, *S*) éthyl naproxène par Lip2p V235S (Figure 26 A) ou V235L (Figure 26 B). Dans le cas de l'éthyl ibuprofène, par exemple, comme le montre le graphique, le phénomène d'arrêt de la réaction a lieu après 40 h. Ainsi, seule la forme acide est présente sous la forme d'un énantiomère pur avec un rendement de 88 %.

La première hypothèse pour expliquer ce phénomène d'arrêt de la réaction est l'inactivation de l'enzyme, cependant cette hypothèse est contredite sur la Figure 26 B par le fait que pour un mutant peu énantiosélectif, le mutant V235L (E=19), la réaction continue pour l'énantiomère non préféré pendant plus de 200 h.

Une autre hypothèse de cet arrêt de la réaction est l'atteinte de l'équilibre thermodynamique.

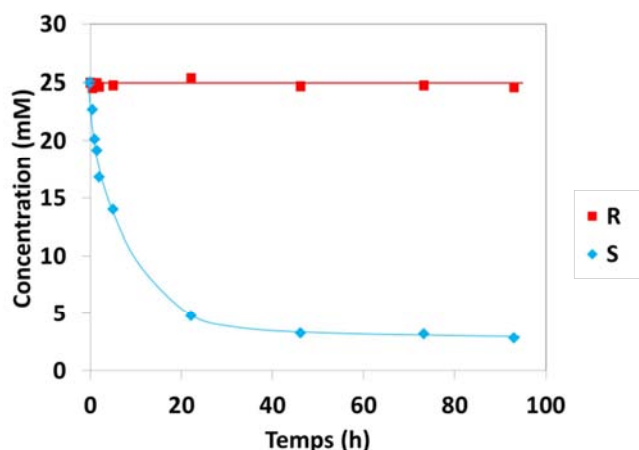


Figure 25: Hydrolyse de l'éthyl ibuprofène par Lip2p V232A en système diphasique *phase aqueuse/décane* Expérience menée en tube Eppendorf (2 mL), 750  $\mu$ L de chaque phase, la phase aqueuse est le surnageant de culture de *Y. lipolytica* sécrétant Lip2p V232A, agitateur de type vortex, température ambiante, 50 mM de (R, S) éthyl ibuprofène

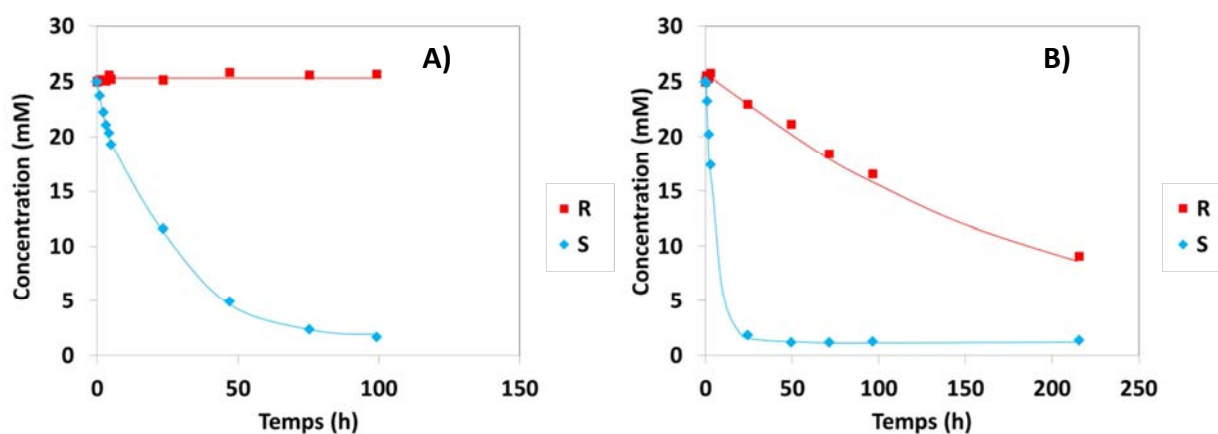


Figure 26 : Hydrolyse de l'éthyl naproxène par lip2p V235S et V235L en système diphasique *phase aqueuse/décane*  
 A) Hydrolyse de l'éthyl naproxène par Lip2p V235S en système diphasique *phase aqueuse/décane*  
 B) Hydrolyse de l'éthyl naproxène par Lip2p V235L en système *diphasique phase aqueuse/décane*  
 Expérience menée en tube Eppendorf (2 mL), 750  $\mu$ L de chaque phase, la phase aqueuse est le surnageant de culture de *Y. lipolytica* sécrétant Lip2p V232A, agitateur de type vortex, température ambiante, 50 mM de (R, S) éthyl ibuprofène

Pour attester le fait que la forte énantiosélectivité du mutant V235S vis-à-vis de l'éthyl naproxène ne vient pas seulement d'une préférence entre les deux énantiomères mais bien que le site actif n'accomode pas/ne permet pas une orientation catalytiquement efficace du (R) énantiomère, la réaction a été effectuée avec l'enzyme V235S dans les conditions

habituelles pendant 100 h. A la fin de ces 100 h, la phase organique est composée essentiellement de (*R*) éthyl naproxène (cf Figure 27). Cette phase organique a été extraite puis mise en contact avec un nouveau volume équivalent de surnageant de culture contenant Lip2p V235S. Dans ces conditions les 1 mM de (*S*) éthyl naproxène restant sont hydrolysés et le (*R*) énantiomère n'est pas catalysé. Cela atteste bien entendu de l'énantiosélectivité très forte de l'enzyme mais appuie également la théorie de l'équilibre thermodynamique. En effet en ne reprenant que la phase organique le (*S*) naproxène (la forme acide) et l'alcool (éthanol) sont écartés ce qui permet très probablement la reprise de la réaction, l'éthanol était majoritairement dans la phase aqueuse et le (*S*) naproxène soit dans la phase aqueuse ou sous forme précipitée.

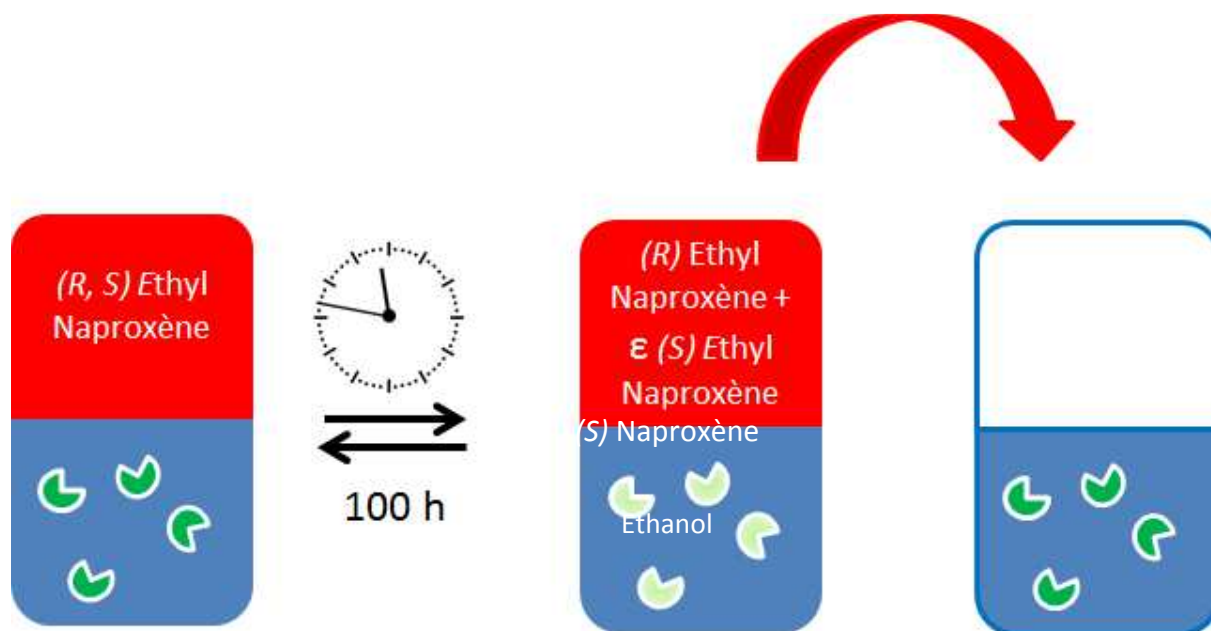


Figure 27 : Représentation schématique de l'expérience consistant à mettre en contact une phase organique, contenant l'éthyl naproxène, avec un surnageant de culture (contenant Lip2p V235S) pendant 100 h puis le remplacer par un second surnageant de culture (contenant Lip2p V235S)

La phase organique était donc constituée après 100 h de 25 mM de (*R*) éthyl naproxène et de 1 mM de (*S*) éthyl naproxène

Si cette hypothèse est juste, l'équilibre thermodynamique de l'énantiomère préféré de l'enzyme V235L est atteint en 24 h environ alors que pour l'autre énantiomère le temps d'atteinte du même l'équilibre thermochimique est supérieur à 200 h.

Il serait intéressant de poursuivre les expériences pour valider qu'il s'agit d'un arrêt de la réaction dû à l'équilibre thermodynamique et proposer des solutions pour obtenir des conversions de 100 %.

De plus d'autres mutations de Lip2p pourraient permettre d'obtenir un mutant avec une énantiosélectivité supérieure à 200 et une énantio-préférence pour l'énantiomère (*S*) pour la résolution de l'éthyl kétoprofène (des mutants avec une (*S*) énantiosélectivité accrue, par rapport à l'enzyme sauvage, mais <200 ayant été mis en évidence).

### **2.3. Screening d'une librairie de mutants semi-rationnelle pour la résolution de mélanges racémiques**

#### **2.3.1. Introduction de la publication**

Afin de trouver des enzymes énantiosélectives vis-à-vis des substrats d'intérêt la méthode présentée jusqu'à présent a été d'améliorer Lip2p par mutagenèse dirigée. Une autre méthode consiste à trouver dans la nature une enzyme sauvage qui pourrait être satisfaisante. La nature offre en effet un réservoir immense d'enzymes, mais la majorité des enzymes connues à ce jour provient d'isolats cultivables, or cette fraction est très limitée. L'apparition croissante de séquences métagénomiques offre la possibilité d'explorer cette diversité, pour élargir le panel d'outils disponibles pouvant être utilisés à l'échelle industrielle et tenter d'apporter des solutions propres alternatives et complémentaires de la chimie de synthèse, ainsi que d'offrir des « briques » métaboliques pour la biologie synthétique. La publication suivante propose une méthode alternative s'inspirant de la métagénomique pour réduire intelligemment le nombre d'enzymes à tester. Nous avons également mis au point un crible permettant d'isoler de cette banque rationnelle des enzymes énantiosélectives pour les substrats d'intérêt, ici le kétoprofène et l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique.

Cette méthode (cf Figure 28) commence par la recherche dans la littérature d'un set de lipases déjà connues pour leur sélectivité vis-à-vis des substrats d'intérêt et proches structurellement. Ensuite sont sélectionnées dans la base de données UniprotKB des enzymes possédant 30 % d'identité sur 70 % de la longueur avec les enzymes du set de référence. Les candidats sont ensuite regroupés en clusters (80 % identité), un candidat est choisi dans chaque cluster en fonction de la disponibilité de son ADN et du % GC de ce dernier puis les enzymes sont clonées pour une sur-expression dans *E. coli* BL21(DE3). Un test colorimétrique basé sur le changement de pH provoqué par la formation de l'acide (montrant que l'enzyme est active car l'hydrolyse à lieu) permet de mesurer l'activité des



protéines produites sur nos mélanges racémiques d'intérêt. Grâce à cette méthode, 2 enzymes ont pu être isolées avec une énantiosélectivité supérieure à 100 vis-à-vis de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique, validant ainsi la méthode.

Finalement, 2 enzymes avec une énantiosélectivité supérieure à 200 vis-à-vis de l'ester éthylique du kétoprofène ont également été découvertes. L'une d'elle permet 100 % d'hydrolyse de l'énantiomère (*R*) en 50 h de réaction.

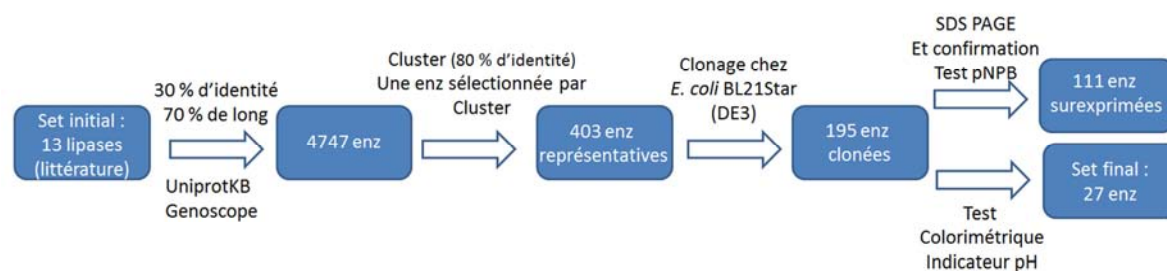


Figure 28 : Principe de la méthode de construction semi-rationnelle d'une banque de mutants destinée à la résolution de racémiques  
enz : enzymes

### 2.3.2. Publication : Screening of a semi-rational lipases library for the resolution of racemic esters of arylalkyl carboxylic acids

## **Screening of a semi-rational lipases library for the resolution of racemic esters of arylalkyl carboxylic acids**

Doriane Gerard<sup>1,2,3</sup>, Jean-Louis Petit<sup>4,5,6</sup>, Hubert Casajus<sup>1</sup>, Adrien Debard<sup>4,5,6</sup>, Virginie Pellouin<sup>4,5,6</sup>, Alain Marty<sup>1</sup>, Véronique De Berardinis<sup>4,5,6\*</sup> and Sophie Duquesne<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

<sup>2</sup> University of Toulouse; INPT, UPS Laboratoire de Génie Chimique; Toulouse France

<sup>3</sup> CNRS, UMR 5503, F-31062 Toulouse, France

<sup>4</sup> CEA, DRF, IG, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

<sup>5</sup> CNRS, UMR8030 Génomique Métabolique, 2 rue Gaston Crémieux 91057 Evry, France

<sup>6</sup> Université d'Evry Val d'Essonne, boulevard François Mitterrand 91057 Evry, France

\* [sophie.duquesne@insa-toulouse.fr](mailto:sophie.duquesne@insa-toulouse.fr), phone number: (33) 561559439

\* [vberard@genoscope.cns.fr](mailto:vberard@genoscope.cns.fr), phone number: (33) 160874587

## Summary

Enantiomerically pure carboxylic acids are major building blocks for the synthesis of a wide range of pharmacological compounds, such as profens. Lipases that could catalyse the resolution of  $\alpha$  bromo phenyl acetic acid and ketoprofen ester were discovered here by a genome mining approach. A library of 195 enzymes was selected by sequence comparison from diverse prokaryotic species as representative of the lipase family diversity. Overexpressed lipases were first screened for their ability to hydrolyse chiral profen-like racemic substrates using a pH-shift based assay. Out of these, 27 enzymes found to be active were subjected to analytical scale biocatalysis in order to determine their efficiency, enantioselectivity and enantiopreference. Two enzymes with *R*-enantiopreference and E-value >100 could be isolated for the resolution of  $\alpha$  bromo phenyl acetic acid racemate, while two other enzymes with reversed enantiopreference and E-value >200 could be isolated for the resolution of ketoprofen racemate. The most promising biocatalyst, LIP9, enabled 100 % conversion of the *R*-enantiomer of ketoprofen ethyl ester in 50 h with an enantioselectivity >200. These are thus industrially relevant biocatalysts and should prevent from time-consuming processes to obtain pure profen enantiomers for pharmaceutical applications.

## Introduction

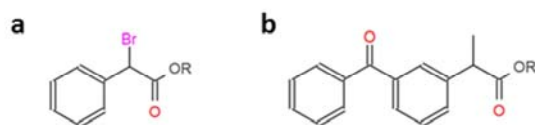
Arylalkyl carboxylic acids are major building blocks for the synthesis of a wide range of chiral pharmacological compounds, including non-steroidal anti-inflammatory drugs (Bouisset and Radisson, 1991). In the case of drugs, enantiopure compounds are often required as in most cases only one enantiomeric form possesses the required property. For instance, ketoprofen, ((*R,S*)-2-(3-benzoylphenyl) propionic acid, Figure 1), is an *in vitro* inhibitor of prostaglandin synthesis that functions as an analgesic and anti-inflammatory agent (Mauleon et al., 1996). It is generally prescribed for arthritis-related inflammatory pains or severe toothaches. Its anti-inflammatory property resides in the *S*-enantiomer (dexketoprofen), while the *R*-enantiomer has toxicity and gastro-intestinal secondary effects (Hutt and Caldwell, 1984). However, ketoprofen is currently produced by chemical synthesis in large quantities and sold as a mixture of its stereoisomers.

Several methodologies have been developed to obtain these molecules in enantiomerically pure forms. Amongst these methods, the kinetic resolution of their corresponding esters by enantioselective hydrolases (esterases or lipases) offers an eco-friendly alternative to chemical

routes. Ester hydrolases (EC 3.1.1-8) are attractive biocatalysts because of their wide range of substrate specificities. They have been widely studied for the resolution of racemic alcohols, acids and esters (Muralidhar et al., 2002; Schulz et al., 2000).

Nevertheless, resolution of ketoprofen (Figure 1b) is still of interest nowadays.

Figure 1. Chemical structure of chiral **a** 2-bromo phenylacetic acid ester and **b** ketoprofen ester. R=EtOH for ethyl ester, R=C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> for octyl ester and R=H for the corresponding acids.



Indeed, many free wild type lipases were tested for their activity towards ketoprofen racemates but mostly lead to enantioselectivity inferior to 200 (Carvalho et al., 2006; Kato et al., 2000; Kim et al., 2008; Ni et al., 2011; Park et al., 1999). When lipase from *Carica papaya* was used for the resolution of ketoprofen 2,2,2-trifluoroethyl thioesters, the E-value obtained was <30 (Ng and Tsai, 2005). Free lipases from *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* were assessed for the molecular recognition of 2-arylpropionic esters. Whereas both lipases gave E-value >50 for the hydrolysis of racemates of fenoprofen and naproxen methyl esters, they were unable to hydrolyse ketoprofen (Botta et al., 1997), thus showing the challenge represented by this molecule. Several strategies were therefore applied to provide lipases with high activity and enantioselectivity for the resolution of ketoprofen, such as process optimization (Liu et al., 2004; Xi and Xu, 2005; Zhang and Liu, 2011; Zhu et al., 2005), addition of surfactants (Long et al., 2007) or directed evolution of wild type enzymes known to be active but with low enantioselectivity (Manetti et al., 2000; Qin et al., 2013; Xi and Xu, 2005; Yoon et al., 2014).

Contrarily to ketoprofen, both plant and microbial lipases were reported efficient for the resolution of less recalcitrant arylalkyl carboxylic acids (Table 1). Variants of the lipase Lip2p from *Yarrowia lipolytica* and *C. rugosa* lipases Lip1 and Lip3 showed both a high enantioselectivity and catalytic efficiency for the resolution of 2-bromophenyl acetic acid ester (Figure 1a) (Bordes et al., 2009; Cambon et al., 2010; Piamtongkam et al., 2011). A high enantioselectivity (E-value >200) was also obtained during the kinetic resolution of (*R,S*)-2-bromo-phenylacetic acid octyl esters by crude latex containing the wild-type lipase from *C.*

*papaya* (Rivera et al., 2013). PestE from *Pyrobaculum* was also reported for its high enantioselectivity (E-value >100) towards ethyl 3-phenyl butanoate (Palm et al., 2011). Lipases from *Bacillus Cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Candida antarctica* and *R. miehei* were also reported enantioselective on profen esters such as flurbiprofen, fenoprofen and naproxen.

Both classical screening of microorganisms and metagenomics functional screening were found efficient to discover suitable enzymes with various targeted properties (Fernández-Álvarez et al., 2010; Kim et al., 2002; Lee et al., 2004; Tasse et al., 2010; Wei et al., 2013; Yoon et al., 2007). Nevertheless, the size of screened libraries is often very large to get lipase hits, especially if enantioselectivity is the searched property.

In this study, we applied a sequence driven approach that was successfully applied to find new biocatalysts from natural diversity (Baud et al., 2014; Guérard-Hélaine et al., 2015; Reignier et al., 2014; Vergne-Vaxelaire et al., 2013). From a set of lipases previously reported as enantioselective towards profen-like substrates, we retrieved prokaryotic sequences from UniprotKB data base with similarity to this set. As discussed earlier, the number of active and enantioselective enzymes for the resolution of ketoprofen racemates is too low to insure the success of such an approach and therefore, all the enzymes characterized for the resolution of racemates from the profen family and with an available sequence were included in the set of references. The high number of candidates retrieved was then reduced by clustering and representatives were selected. To our knowledge, no such large genome mining approach has ever been described in literature for lipase discovery. We built this semi-rational lipases mini library and cell-free extracts were then screened in 96-microwells for the hydrolysis of profen racemates. 2-bromo phenylacetic acid ester, an important intermediate in the synthesis of many drugs, such as prostaglandin, prostacyclin, semi-synthetic penicillin or thiazolium salts was chosen as a model, less hindered substrate, and ketoprofen ester was then considered. From this low sized library, we could isolate biocatalysts efficient for the enantioselective hydrolysis of ketoprofen.

## Results and discussion

### Literature-guided construction of a semi-rational lipases library

Since natural promiscuous catalytic properties are widespread in enzyme families, sequence comparisons against prokaryote proteins (UniprotKB proteins and Genoscope metagenome resource) with already known lipases (reference set) were conducted and allowed selection of 4747 candidate proteins (see Experimental section). The reference set was composed of 7 lipases from Eukaryotes and 6 from Prokaryote species (Table 1) selected from bibliographic survey following the two next criteria : i) identified and available protein sequence, and ii) experimentally proven to resolve a racemic mixture of esters of arylalkyl carboxylic acids related to compounds **a** and/or **b**.

Table 1. Reference set

Gene names	Protein UniprotKB identifiers	Organisms	Assayed substrate	Litterature
<i>estA</i>	A0PJ11	<i>Bacillus cereus</i>	Ethyl esters of flurbiprofen, ketoprofen, ibuprofen	Chen et al., 2007; Qian et al., 2007
<i>lipCE</i>	A7J993	<i>uncultured bacterium</i>	<i>p</i> NP esters of ibuprofen, 2-phenyl-propanoic/butanoic ethyl ester	Elend et al., 2007; Fernández-Álvaro et al., 2010
<i>lipA</i>	P22088	<i>Burkholderia cepacia</i>	2-chloro ethyl 2-bromophenylacetate; ethyl-3phenyl butyrate	Guieysse et al., 2003b; Lafaquière et al., 2009
<i>esf</i>	Q0MVP2	<i>Serratia marcescens</i>	Flurbiprofen ethyl ester, naproxen methyl ester, ketoprofen ethyl ester	Bae et al., 2006; Lee et al., 2007; Long et al., 2007; Zhao et al., 2008
<i>estA3</i>	Q1I197	<i>uncultured bacterium</i>	3-phenyl-butanoic ethyl ester, <i>p</i> NP esters of ibuprofen and naproxen	Elend et al., 2006; Fernández-Álvaro et al., 2010
<i>pestE</i>	Q8NKSO	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	3-phenylbutanoic acid ethyl ester	Palm et al., 2011
<i>lip1</i>	P20261	<i>Candida rugosa</i>	Fenoprofen and naproxen methyl esters, ketoprofen ethyl/2-chloroethyl ester; 2-bromo phenylacetic acid octyl ester, ibuprofen methyl ester	Botta et al., 1997; Gu et al., 1986; Kim et al., 2000; Lee et al., 1995; Liu et al., 2004; Manetti et al., 2000; Piamtongkam et al., 2011; Siódmiak et al., 2013; Xi and Xu, 2005; Xin et al., 2000; Zhu et al., 2005
<i>lip3</i>	P32947	<i>Candida rugosa</i>		
<i>lip4</i>	P32948	<i>Candida rugosa</i>		
<i>PaG_04504</i>	W3VKA4	<i>Pseudozyma aphidis</i>	<i>p</i> NP ester of ibuprofen	Sandström et al., 2012
<i>N/A</i>	P19515	<i>Rhizomucor miehei</i>	Fenoprofen and naproxen methyl ester, ibuprofen methyl to butyl esters, ibuprofen	Botta et al., 1997; Habibi et al., 2013; Mohammadi et al., 2016; Yousefi et al., 2014
<i>N/A</i>	P41365	<i>Pseudozyma antarctica</i>	Ketoprofen, <i>p</i> NP ester of ketoprofen, ibuprofen methyl to butyl esters, ibuprofen	Arroyo and Sinisterra, 1995; Mohammadi et al., 2016; Qin et al., 2013; Yousefi et al., 2014
<i>lip2</i>	Q9P8F7	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2-bromo phenylacetic acid octyl ester	Bordes et al., 2009

Among the candidate proteins, 403 genes were selected as representative and 195 were successfully cloned in an expression vector using automated platform facilities. Notably, PestE from *Pyrobaculum calidifontis* represents 72 % of the enzymes to be tested. This enzyme is amongst the rare that is enantioselective towards esters of both chiral tertiary alcohols and phenylalkyl carboxylic acids. Enzymes were over-expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain. Out of these, overexpression of 111 proteins was confirmed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE).

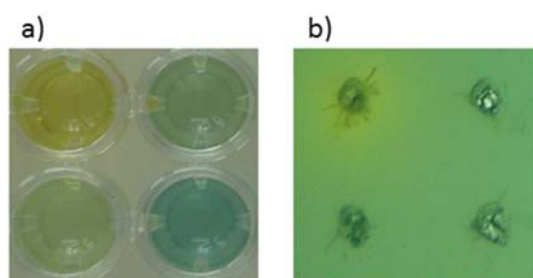
### *Lipase production and activity assessment*

Lipases were produced as recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) strain. Strains were cultivated in 96 deep-well plates at 20 °C in rich medium containing sorbitol and betaine to avoid the formation of inclusion bodies. Comparison of protein content from total induced cells and soluble extracts showed that 57 % of the constructs gave large amounts of soluble recombinant proteins. Lipase activity was measured directly on cell free extracts in 96 micro-well plates using the classical assay of *para* nitrophenol butyrate (*p*NPB) hydrolysis. Half of *E. coli* extracts, each containing a putative lipase, produced significant activity on *p*NPB (over 0.1 U/mL), consistent with 57 % of the lipase library being produced as cytosolic from SDS-PAGE analysis (data not shown). Activity ranged from 0 to 1.2 U/mL (0.54 U/mL average activity).

### *Identification of hydrolases active towards the esters of phenylalkyl carboxylic acids*

In the first step, the constructed library consisting of 195 deep-well overexpressed lipases, was screened both on solid and liquid medium for its ability to hydrolyse esters **a** and **b** using a pH-shift based assay. The screening assay was conducted with HEPES buffer (pKa 7.5) and bromothymol blue (BTB, pKa 7.3) as pH indicator (Baumann et al., 2001; Janes et al., 1998). This enables the reaction course to be easily visualised: upon acid release in the medium, the colour of active hits turned from blue (pH 7.5) to green (ca. pH 6–7) or yellow (pH <6); Figure 2 revealing the ability of the active clones to hydrolyse esters **a** or **b**.

Figure 2. The library was screened for the identification of lipases active on racemic mixtures of octyl ester of 2-bromo phenylacetic acid and ethyl ester of ketoprofen. Positive colonies were verified by the colour shift from blue to yellow of bromothymol Blue during the reaction. a) Liquid screening and b) solid screening.



Lipases were considered active on the racemic mixture of **a** when both i) the OD decrease was over 50 % (corresponding to a conversion of 7 %) in the liquid screening and ii) the halo around the cytosolic fraction deposit changed colour in solid screening. This led to the identification of 23 active enzymes on substrate **a**. As ester **b** is highly more difficult to hydrolyse, criteria for selection were chosen less stringent: lipases were considered active when at least one screening assay was positive. This led to the identification of 14 active enzymes on **b**, 10 of them are also active on substrate **a**. Overall, 14 % of the library was found active on the racemic mixture of at least one of the esters assayed (27 enzymes), and 5 % was found active on both esters (Table 2).



Table 2. Set of 27 enzymes active on the racemic mixture of at least one of the esters assayed.

Active lipases	UniprotKB identifier	Protein names	Protein length (AA)	Organisms	Active on Ester of
LIP1	Q976W8	Carboxylesterase (EC 3.1.1.1)	303	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	<b>a</b>
LIP2	Q9XC26	AreA (Esterase for aryl ester catabolic pathway) (EC 3.1.1.-)	326	<i>Acinetobacter sp. (strain ADP1)</i>	<b>a</b>
LIP3	A6F4A4	Esterase/lipase/thioesterase	315	<i>Marinobacter algicola</i>	<b>a</b>
LIP4	D0SGF6	Hydrolase, alpha/beta domain protein	357	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<b>a</b>
LIP5	D0T835	Esterase	356	<i>Acinetobacter radioresistens SH164</i>	<b>a and b</b>
LIP6	E1QSH8	Alpha/beta hydrolase fold-3 domain protein	309	<i>Vulcanisaeta distributa</i>	<b>b</b>
LIP7	E8V7M7	Alpha/beta hydrolase fold-3 domain protein	321	<i>Terriglobus saanensis</i>	<b>b</b>
LIP8	H1WL3	Putative Esterase/lipase (EC 3.1.1.-)	314	<i>Arthrospira sp. PCC 8005</i>	<b>a and b</b>
LIP9	Q0VQ49	Carboxylesterase (EC 3.1.1.1)	505	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	<b>a and b</b>
LIP10	Q5WDM1	Carboxylesterase (EC 3.1.1.1)	248	<i>Bacillus clausii</i>	<b>a</b>
LIP11	A0QYY3	Alpha/beta hydrolase fold-3 (Esterase)	314	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<b>a</b>
LIP12	A7HTQ1	Alpha/beta hydrolase fold-3 domain protein	313	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	<b>a and b</b>
LIP13	A7HU32	Alpha/beta hydrolase fold-3 domain protein	297	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	<b>a and b</b>
LIP14	B2HIK1	Lipase/esterase LipN	372	<i>Mycobacterium marinum</i>	<b>a</b>
LIP15	B7X5G4	Alpha/beta hydrolase fold-3 domain protein	315	<i>Comamonas testosteroni</i>	<b>a and b</b>
LIP16	C8WUR3	Alpha/beta hydrolase fold-3 domain protein	310	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	<b>a</b>
LIP17	D5C8Z5	Carboxylesterase type B	501	<i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae</i>	<b>a</b>
LIP18	G7DG88	Acetyl-hydrolase	319	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<b>a and b</b>
LIP19	G8TV28	Uncharacterized protein (EC 3.1.1.3)	304	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	<b>a and b</b>
LIP20	H0S5Q2	Putative lipase/esterase (EC 3.1.1.3)	320	<i>Bradyrhizobium sp. ORS 285</i>	<b>a</b>
LIP21	H1N7G3	Esterase/lipase/thioesterase	308	<i>Singulisphaera acidiphila</i>	<b>a</b>
LIP22	H6N5B3	Putative esterase	323	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	<b>a and b</b>
LIP23	Q137T9	Alpha/beta hydrolase fold-3	314	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<b>a</b>
LIP24	Q1GSW0	Alpha/beta hydrolase fold-3	315	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	<b>b</b>
LIP25	Q1J3I3	Alpha/beta hydrolase fold-3	323	<i>Deinococcus geothermalis</i>	<b>a and b</b>
LIP26	Q1LMA4	Esterase/lipase (EC 3.1.1.-)	344	<i>Ralstonia metalliduran</i>	<b>a</b>
LIP27	Q5LS10	Beta-lactamase	411	<i>Silicibacter pomeroyi</i>	<b>b</b>

#### Determination of enantioselectivity and enantiopreference of active enzymes

The 27 enzymes able to hydrolyze a racemic mixture of esters **a** or **b** were produced in flasks and the enantioselectivity of these enzymes in the corresponding *E. coli* extracts were then determined in biphasic medium. Table 3 summarises the results obtained for the 27 enzymes isolated from the primary screen. *p*NPB activities are also given. As shown by the results of *p*NPB hydrolysis, all the selected candidates are effective ester hydrolases, despite a sometimes approximate sequence based annotation. Nevertheless, this activity on model substrate does not presume their potential on other substrates such as **a** and **b** tested in this study.

Table 3. Lipase activity was assessed on the model substrate *p*NPB at pH 7.2 and 25 °C. Cell extracts were tested at room temperature for their activity and enantioselectivity on esters **a** or/and **b** (following the results of Table 2) in biphasic medium (cell extract: decane, 50:50). Enantioselectivity (E) is given as the ratio between conversions of the preferred enantiomer to the less hydrolyzed enantiomer after 24 h reaction in biphasic medium at pH 7.5 and 25 °C. Highlighted in orange are the enzymes selected for further study. These were selected when both conversion >15 % and E >15; Enantiopreference of the selected enzymes is indicated in parenthesis. nd indicates not determined, when the enzyme was not tested on the substrate.

Active lipases	Cell extract <i>p</i> NPB (U/mL)	Octyl ester of <b>a</b> bromo phenyl acetic acid			Ethyl ester of ketoprofen		
		S %	R %	E	S %	R %	E
LIP1	2.3	10	2	5		nd	
LIP2	125.6	28	26	1		nd	
LIP3	3.3	1	8	8		nd	
LIP4	3.8	5	7	1		nd	
LIP5	26.4	20	26	1	30	20	1.5
LIP6	2.4		nd		0	0	/
LIP7	1.8		nd		1	3	3
LIP8	54.2	27	20	1	19	51	3
LIP9	106	0	0	/	0.0	15	>200 (R)
LIP10	11.9	0	0	/		nd	
LIP11	78	0.5	21	42 (R)		nd	
LIP12	3.6	2	3	0.5	17	28	2
LIP13	2	0.0	3	>200	5	12	2
LIP14	44.7	99	5	18 (S)		nd	
LIP15	73	2.8	0.0	>200	31	29	1
LIP16	242.3	33	11	3		nd	
LIP17	15.3	0.28	1.30	5		nd	
LIP18	52.5	7	4	2	0.1	0.7	7
LIP19	49.6	12	9	1	8	7	1
LIP20	537.5	0	0	/		nd	
LIP21	81.9	14	5	3		nd	
LIP22	5.3	1	36	33 (R)	20	25	1
LIP23	184.1	7	6	1		nd	
LIP24	67.1		nd		0	0	/
LIP25	42.2	76	25	3	56	27	2
LIP26	10.2	27	1	24 (S)		nd	
LIP27	80.3		nd		29	0.0	>200 (S)

Criteria for selection of relevant enzymes were as follow: conversion for the best recognized enantiomer over 15 % and punctual enantioselectivity (ratio of enantiomer conversions at final point, *i.e.* 24 h reaction) over 15 for **a** and **b**: 4 and 2 enzymes were thus considered as relevant for further study on enantioselective hydrolysis of 2-bromo phenylacetic acid and ketoprofen ester, respectively.

At this stage, four enzymes, LIP11, LIP14, LIP22 and LIP26, were found very effective on 2-bromo phenylacetic acid octyl ester. LIP11 and LIP22 showed an E-value of 42 and 33 respectively, with 21 and 36 % conversion of the *R*-enantiomer after 24 h reaction

respectively. LIP14 and LIP26 gave E-value of 18 and 24, with 99 and 27 % of the *S*-enantiomer, respectively, after 24 h reaction.

In addition, two other enzymes showed an enantioselectivity superior to 200 during the hydrolysis of ketoprofen, namely LIP9 from *Alcanivorax borkumensis* and LIP27 from *Silicibacter pomeroyi*, with 15 % of the *R*-enantiomer and 29 % of the *S*-enantiomer being hydrolyzed after 24 h reaction, respectively.

These effective enzymes able to hydrolyze a racemic mixture of esters **a** or **b** were purified by affinity chromatography for precise determination of their enantioselectivity and potential.

### *Kinetics of racemic resolution*

After purification, the 6 relevant lipases were tested on the hydrolysis of **a** and **b** esters. Table 4 summarizes the results obtained. Enantioselectivity (E) is given as the ratio between initial hydrolysis rates of the preferred enantiomer to the non-preferred enantiomer, the reaction is followed over 50 to 96 h. The specific activities of the purified enzymes during *p*NPB hydrolysis, as well as specific initial rates of hydrolysis of the preferred enantiomer are given.

Table 4. Purified lipases were assessed on the hydrolysis of **a** or/and **b** (following the results of Table 2, nd indicates not determined when the enzyme was not tested on the substrate) esters at pH 7.5 and 25 °C, in biphasic medium (buffer: decane, 50:50). Enantioselectivity (E) is given as the ratio between initial hydrolysis rates of the preferred enantiomer to the less hydrolyzed enantiomer, the reaction is followed over 50 to 96 h. Enantiopreference is indicated in parenthesis. The specific activities of the purified enzymes during *p*NPB hydrolysis, as well as specific initial rates of hydrolysis of the preferred enantiomer are given.

	<i>p</i> NPB (U/mg)	Octyl ester of $\alpha$ Bromo phenyl acetic acid E (Vi ratio), Vi	Ethyl ester of Ketoprofen E (Vi ratio), Vi
LIP9	151.3	nd	>200 ( <i>R</i> ) 6.91 $\mu\text{mol/h/mg}$
LIP11	10.3	127 ( <i>R</i> ) 0.14 $\mu\text{mol/h/mg}$	nd
LIP14	24.0	14 ( <i>S</i> ) 1.09 $\mu\text{mol/h/mg}$	nd
LIP22	0.8	101 ( <i>R</i> ) 0.24 $\mu\text{mol/h/mg}$	nd
LIP26	2.7	43 ( <i>S</i> ) 0.07 $\mu\text{mol/h/mg}$	nd
LIP27	53.4	nd	>200 ( <i>S</i> ) 0.31 $\mu\text{mol/h/mg}$

In these conditions, two enzymes showed promising results for the hydrolysis of 2-bromo phenyl acetic acid octyl ester. LIP11 is *R*-enantioselective and very specific (E-value of 127), despite a low conversion rate (0.14  $\mu\text{mol/h/mg}$ ). Finally, LIP22 is also *R*-enantioselective with E-value of 101 and an initial rate of 0.24  $\mu\text{mol/h/mg}$ .

Two enzymes showed very good results for the hydrolysis of ketoprofen ethyl ester, with spectacular enantioselectivity (E-value >200). LIP9, which is *R*-enantioselective, has both a high initial rate of conversion (6.91  $\mu\text{mol/h/mg}$ ) and lead to total conversion of the *R*-enantiomer in 96 h reaction. The *R*-stereopreference towards ketoprofen ethyl ester of this new biocatalyst would allow the direct production of the desired (+)-*S*-ketoprofen, as for its biological properties, as the unreacted substrate from the enzymatic reaction remains in the organic phase and can be recovered without further chemical manipulation. Finally, LIP27 was found totally *S*-enantioselective (E-value >200) for the hydrolysis of ketoprofen ethyl ester, with a moderate initial rate (0.31  $\mu\text{mol/h/mg}$ ) but no inactivation on the reaction time, thus leading to average 30 % conversion after 96 h reaction.

The high number of positive hits obtained with this method has to be noticed. Indeed, reports on the functional screening of metagenomes to isolate lipases often lead to few hits despite the size of the screened libraries, and the number of enantioselective lipases able to carry on the resolution of profen racemic mixture is even lower. As so, Cieśliński et al., 2009 isolated one lipase from the screening of 2.8 10<sup>4</sup> kb of metagenomic DNA from antarctic soil on olive oil and Rondon et al., 2000 isolated 2 lipases from the screening of 106 kb of metagenomic DNA from soil on Bacto Lipid. Yoon and colleagues started from more than 1.2 10<sup>6</sup> kb genomic DNA and only one positive clone of a thermostable *S*-ketoprofen specific esterase was identified (Yoon et al., 2007). Similarly, Elend et al., 2006 isolated 7 esterases over 130 000 kb genomic DNA, among which only 1 was found active on ibuprofen and naproxen.

Moreover, all the enantioselective lipases isolated in our study were discovered in sequenced isolated genomes from public database, even though no experimental characterization had ever been reported before for these enzymes.

#### *Sequence analysis of the promising hits*

LIP11 and LIP22 showed promising results for the resolution of 2-bromo phenyl acetic acid octyl ester, while LIP9 and LIP27 showed promising results for the resolution of ketoprofen ethyl ester. Their accession number, putative annotated function, producing organism and amino-acid length are given in Table 2.

The best hit in the reference set for LIP11 and LIP22 was PestE from *Pyrobaculum calidifontis* (41 %, 36 % and 32 % of identity with PestE, respectively). PestE was shown to have E-value >100 towards ethyl 3-phenyl butanoate (Palm et al., 2011). The difference between 2-bromo-phenylacetic acid and this substrate is that the bromine is replaced by methyl and the carbon chain is one carbon longer. Its crystal structure was solved (PDB id: 2WIR, 2YH2, (Palm et al., 2011) and could explain the difference in enantioselectivity experimentally observed towards tertiary alcohol (E-value =2-4) and carboxylic acid ester (E-value >100) (as exemplified for the two model substrates 3-phenylbutanoic acid ethyl ester and 1,1,1-trifluoro-2-phenylbut-3-yn-2-yl acetate). For both enantiomers of the tertiary alcohol, orientations in two binding pockets were obtained without significant energy differences, whereas two different orientations with significant energy differences were found for the two enantiomers of chiral carboxylic acid esters.

LIP9 from *Alcanivorax borkumensis* was retrieved from P32948 from the reference set, an isoform of *C. rugosa* lipase. These isoforms were extensively studied for their enantioselectivity towards profen esters, such as naproxen, ibuprofen, ketoprofen and fenoprofen methyl esters (Botta et al., 1997; Gu et al., 1986; Manetti et al., 2000; Piamtongkam et al., 2011) and derivatives such as 2-bromo phenylacetic acid octyl ester (Botta et al., 1997; Gu et al., 1986; Manetti et al., 2000; Piamtongkam et al., 2011). These isoforms presenting poor enantioselectivity, various strategies were employed to improve the enantioselectivity such as the immobilisation (Liu et al., 2004; Xi and Xu, 2005; Zhu et al., 2005) or two step acetone treatment (Kim et al., 2000) but it was not fully successful reaching only an enantioselectivity of 153 (Xi and Xu, 2005). LIP9 also shares 32 % identity with PnbA from *Bacillus subtilis* which was studied for its activity and enantioselectivity towards tertiary alcohols. Rational mutagenesis on PnbA generated mutants with improved or reverse enantioselectivity (Bartsch et al., 2008; Heinze et al., 2007; Henke et al., 2002).

LIP27 is annotated as a predicted beta-lactamase and was retrieved by reference Q11197 with 39.4 % identity; this latter, isolated from a drinking water biofilm metagenome, was selected in the primary reference set for its activity towards the nonsteroidal anti-inflammatory drugs and derivatives ibuprofen and naproxen (Elend et al., 2006). Moreover, it was also successfully applied in the kinetic resolution of 3-phenyl butanoic acid ethyl ester because of

its high enantioselectivity (E-value =96) (Fernández-Álvaro et al., 2010). LIP27 shows identity with many predicted  $\beta$ -lactamase from various organisms, but with few experimentally characterized proteins. Amongst them, LIP27 shows 43.0 % identity with F2WMW3, a family VIII esterase from uncultured bacterium whose  $\beta$ -lactamase activity was reported (Yu et al., 2011). Moreover, LIP27 presents 30 % identity with EstB from *Burkholderia gladioli*. This esterase was evolved for improved or reverse enantioselectivity during resolution of methyl- $\beta$ -hydroxyisobutyrate (Ivancic et al., 2007).

Our hit enzymes showed high identity neither with formerly characterized lipases known to resolve profen racemic mixture, nor between them (ranging from 17 % to maximum 37 % identity for LIP11/LIP14). This definitively shows the great potential of our rational library creation to isolate new biocatalysts with desired substrate affinity.

## Conclusions

A rational exploration of lipase/esterase biodiversity by a genome mining approach was conducted through the screening of a semi-rational mini library of lipases. Enantioselectivity towards two phenylalkyl carboxylic acids of pharmaceutical interest was screened. Among 195 candidates, efficient and highly enantioselective catalysts have been found for each substrate with complementary enantiopreference. On the one hand, LIP9 shows both high activity and enantioselectivity towards ketoprofen ester racemates, and could thus be included in a chemo-enzymatic synthesis process. On the other hand, LIP11, LIP14, LIP22 and LIP27 are excellent starting point for protein engineering to enhance enzyme capabilities for pure profen enantiomers production: deeper work on sequence analysis and molecular modelling could provide targets for site-directed mutagenesis in order to further increase or reverse our biocatalysis enantioselectivity.

## Experimental procedures

### Materials

Ampicillin and isopropyl-b-d-thiogalactopyranoside (IPTG) were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France); unless stated, other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.). Oligonucleotides were from Sigma-Genosys.

### *Strains*

*E. coli* strains were purchased from Promega; *E. coli* strain DH5 $\alpha$  ( $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ m15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*rk-*, *mk+*), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZYAargF*) U169).

*E. coli* BL21(DE3)Star (*fhuA2* [*lon*] *ompT gal* ( $\lambda$ DE3) [*dcm*]  $\Delta$ *hsdS*;  $\lambda$ DE3 =  $\lambda$  *sBamHI*  $\Delta$ *EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)* *i21*  $\Delta$ *nin5*), used for protein production, were purchased from Invitrogen.

### *Set up of the candidate collection to be screened*

The collection of lipase candidates was developed in a three-step process.

(1) A reference set was created by selecting known lipases from literature experimentally proven to resolve a racemic mixture of esters of arylalkyl carboxylic acids related to compounds a and b. The 13 enzymes are summarized in Table 1. (2) This set was then compared to UniprotKB or from Genoscope metagenomics bacterial encoding genes using low stringency parameters (>30 % on minimum 70 % length). (3) A single linkage clustering based on 80 % identity was applied to organize them. One enzyme by cluster was selected as representative and for which genomic DNA was available in the Genoscope strain library.

### *Cloning, expression and cell free extract preparation*

Candidate enzymes for high throughput screening were cloned and over expressed in 96-microwell in an expression vector using automated platform facilities. The choice of the primers was based on the Primer3 program (Rozen and Skaletsky, 2000). Oligonucleotides were from Sigma-Genosys. Specific extensions are added to the primers for cloning into our plasmid pET22b(+) (Novagen) modified for ligation independent cloning. A 6-histidine tag was added in the in the N-terminal part of the protein for purification process. Primers used for the cloning of the 27 candidate are presented in SI Table 5. The cloning was done into plasmid pET22b(+), the protein production in *E. coli* BL21Star (DE3) strains (Invitrogen) and cell lysate preparations were carried out as previously described (Vergne-Vaxelaire et al., 2013). Lysis was done in buffer HEPES 50 mM pH 7.5 and 50 mM NaCl. After centrifugation to clarify the cell extract, supernatants were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) to check for recombinant protein production. Negative control lysate for enzymatic assays was done by transforming *E. coli* BL21Star (DE3)Star strains by plasmid pET22b(+). Protein concentrations were determined

by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad). The samples were stored at -80 °C.

Table 5. Primers used for the cloning of the 27 candidate

	Primer-5'	Primer-3'
LIP1	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATATAGACCCTAAAATTA	GTGTAATGGATAGTGATCTTATTTCCGTAATACTTT
LIP2	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATTTACAGAGTTTAGATCCTCAACTGGC	GTGTAATGGATAGTGATCTTATTTGGATTTTGTATTGTTT
LIP3	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATGCACCTCGATACCGCC	GTGTAATGGATAGTGATCTTAAACGGATGTTTTTGCAATG
LIP4	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATGGCGTGTGAATCAAACCTTTAC	GTGTAATGGATAGTGATCTTATTTGGCATTCTTATCCC
LIP5	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATGCAGTTTCTAACTTGGC	GTGTAATGGATAGTGATCTTATGCTGCTTATTTCCAGAATTAC
LIP6	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCCCTGGATCCGGCG	GTGTAATGGATAGTGATCTTAAACTTGTGTATAAAAAGACCTGC
LIP7	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATAGCGCATCGATCCC	GTGTAATGGATAGTGATCTTAGGCAAACGCITTTTCGAAGT
LIP8	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATAACCATTACAGTTAATCCC	GTGTAATGGATAGTGATCTTAGCTTTTATGGGAAAATCTCTG
LIP9	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATACAGCAATAATTCGTCAGG	GTGTAATGGATAGTGATCTTAAACCCGGGATGATG
LIP10	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATAAATTAGTGCCACCTAAC	GTGTAATGGATAGTGATCTTAGTTTGACCAATCTAAG
LIP11	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCGATCGATCCCATTG	GTGTAATGGATAGTGATCTTATCGGGTCGACTGCC
LIP12	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATTCACCTCGATCCACAAGC	GTGTAATGGATAGTGATCTTAGGCCAGTGCTTCCTTC
LIP13	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATAGTCTTGAGGAACCTTGCTG	GTGTAATGGATAGTGATCTTATCCGAGCTTTGTATCCAG
LIP14	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATACAAATAGCCTGCCAGGTG	GTGTAATGGATAGTGATCTTAAACCCGGGTCAGGTG
LIP15	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATGCTCTCGATCCCCATC	GTGTAATGGATAGTGATCTTAGCGGGCTCTCGTTGTG
LIP16	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCGCTCGATCCCGTC	GTGTAATGGATAGTGATCTTAGGCCAGCGCGTCTCG
LIP17	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCAATATCCCCTCCGCC	GTGTAATGGATAGTGATCTTAAATCGAGGTTAACGTGGTG
LIP18	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCCGCACCGCTCGAT	GTGTAATGGATAGTGATCTTAGATTCGCGCGCGAG
LIP19	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCACTTGATCCGCGG	GTGTAATGGATAGTGATCTTAGTTCGATCCGCTCCAAAAAC
LIP20	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCCGTTCAACTCGATG	GTGTAATGGATAGTGATCTTATATGCCCGCTGGCCA
LIP21	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCTCTCGACCCACAG	GTGTAATGGATAGTGATCTTAAAGCCAGGGCGCCTT
LIP22	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATGCCGACCTCAAGAATC	GTGTAATGGATAGTGATCTTACGAGACCGGTGAACTC
LIP23	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCAGCACAACTCGATCC	GTGTAATGGATAGTGATCTTACAGCGCCTTCAGCCAG
LIP24	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATACCGACGGCACCCCC	GTGTAATGGATAGTGATCTTATGCCGCGCGGTTAGC
LIP25	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCTTGGACCCCATC	GTGTAATGGATAGTGATCTTACTCAAGACGTTCTCCTTC
LIP26	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCGCTCTACGGAATCAC	GTGTAATGGATAGTGATCTTATATCCCGAACGCCTT
LIP27	AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCCCGACCCCGGTTAC	GTGTAATGGATAGTGATCTTATCCGCATAATGCTCC

### Protein production

*E. coli* BL21(DE3) transformed with expression vectors were grown overnight in LB ampicillin at 37 °C. Microplates or Erlenmeyer flasks containing TB (Tartoff and Hobbs, 1987) ampicillin were inoculated from a microplate 96-footprint or to an OD 600 nm of 0.05 respectively and grown at 37 °C. When OD 600 nm reached 0.8-1.2 or 2, respectively, protein production was induced with 1 mM IPTG and the strains were further grown overnight at 20 °C. Bacterial pellet was frozen at 80 °C for 2 hours and resuspended in 50 mM HEPES



buffer pH7.5 supplemented with 50 mM NaCl, 0.07 % Lysonase bioprocessing reagent (Novagen) and 1 mM pefabloc and the suspension was incubated 1 h at 25 °C. The suspension was further sonicated 2 minutes and cell debris were removed by centrifugation (30 minutes at 11 000 rpm). The soluble fraction was filtrated 0.45µm and used for reaction or affinity purification.

#### *His tag affinity chromatography: Protein purification*

Selected enzymes were overexpressed and purified by loading the crude extract onto a Ni-NTA column (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. Lysis buffer was HEPES 50 mM PH 7.5, NaCl 50 mM, Imidazole 30 mM, Glycerol 10 %. Elution buffer was HEPES 50 mM PH 7.5, NaCl 50 mM, Imidazole 250 mM, Glycerol 10 %. The enzyme purity was analyzed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE). Protein concentrations were determined by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad). Samples were stored at -80 °C and dialyzed against HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 50mM before activity measurements.

#### *Determination of lipase activity*

Lipase activity was determined by monitoring the hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) into butyric acid and *p*-nitrophenol. Lipase activity was measured in 96-well microplates filled with 20 µL of the cell extract, 175 µL of a 100 mM phosphate buffer pH 7.2 containing 100 mM NaCl. The reaction was started with addition of 5 µL *p*-NPB (40 mM in 2M2B) and activity was measured by following absorbance at 405 nm at 25 °C for 10 min using the EON tunable microplate reader apparatus (Thermo Fisher Scientific). One unit of lipase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 µmol of fatty acid per min at 25 °C and pH 7.2

#### *General procedure for the synthesis of the phenylalkyl carboxylic acid ethyl and octyl esters*

Ethyl and octyl esters were synthesized as previously described elsewhere (Guieysse et al., 2003a). <sup>1</sup>H spectra were recorded on a Bruker AC-200.1 (<sup>1</sup>H 200.1 MHz) spectrometer.

### *High-throughput liquid and solid screening*

The test for hydrolytic activity towards the target substrates was based on a pH assay (Baumann et al., 2001). Wells were filled with 10  $\mu$ L of a substrate stock solution (final concentration 1.6 mM), 10  $\mu$ L of a solution of pH indicator bromothymol blue (BTB final concentration 0.25 mM), 10  $\mu$ L of *E. coli* extract containing the different lipases and 170  $\mu$ L of HEPES buffer (final concentration 1 mM, pH 7.5) to get a final volume of 200  $\mu$ L. A negative control (extract from culture of *E. coli* transformed with empty vector) was present in each plate. Each plate was then incubated at 37 °C and 600 r.p.m for 72 h. The standard curve realised with 2-bromo phenyl acetic acid showed that a 50 % decrease in BBT absorbance at 620 nm corresponds to 7 % hydrolysis. Active lipases were then identified by visible colour changes and used in analytical scale experiments.

The solid screening method is the same as the liquid one: briefly extracts from *E. coli* lipase producing strains are deposited on Q-trays containing 20 g/L agar, 1.6 mM ester a, b or c), 0.25 mM BBT in 1 mM HEPES at pH 7.5. Q-Trays were incubated until 6 days at 37 °C.

### *General procedure for lipase-catalysed analytic scale kinetic resolutions*

Hydrolysis was carried out in 2 mL eppendorf tubes containing a biphasic medium composed of 0.75 mL dried decane containing the racemic octyl esters **a** or ethyl esters **b** (50 mM) and 0.75 mL of the aqueous enzymatic solution. The mixture was shaken in a Vortex Genie 2 (D. Dutscher, Brumat, France) at 25 °C. At regular time intervals, the progress of the reaction was followed by taking samples from the organic phase after phase separation by centrifugation.

The HPLC device was equipped with a chiral column: Chiralpack OJ (25 cm x 4.6 mm) (Daicel Chemical Industries Ltd, Japan) connected to a UV detector (at 254 nm). A flow rate of 1.0 mL/min was used. The mobile phase was composed of a mixture of n-hexane/isopropanol [80:20 v/v for ( $\pm$ )-2-bromo phenyl octyl acetate and 98/2 v/v for ( $\pm$ )-ethyl ketoprofen]. From HPLC results, the total conversion (C) of both enantiomers and *E*-values (*E*) were calculated as defined below:

$E = (v_iS/v_iR)$  for a *S* enantioselectivity

$E = (v_iR/v_iS)$  for a *R* enantioselectivity

With  $viS$  and  $viR$  corresponding to the initial rates of  $S$  and  $R$  enantiomer consumption respectively.

### Acknowledgments

We thank the ICEO facility dedicated to enzyme screening and discovery, and part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA) for providing access to the screening equipment. We also thank the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) for funding. Finally, we thank the Pôles de Recherche et d'Enseignement Supérieur de l'Université de Toulouse and the Région Midi-Pyrénées, France for the PhD grant of Doriane Gérard.

### References

- Arroyo M, Sinisterra JV. 1995. Influence of chiral carvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.* **17**:525–530.
- Bae HA, Lee KW, Lee YH. 2006. Enantioselective properties of extracellular lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of (S)-flurbiprofen. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **40**:24–29.
- Bartsch S, Kourist R, Bornscheuer UT. 2008. Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**:1508–1511.
- Baud D, Saaidi PL, Monfleur A, Harari M, Cuccaro J, Fossey A, Besnard M, Debard A, Mariage A, Pellouin V, Petit JL, Salanoubat M, Weissenbach J, De Berardinis V, Zaparucha A. 2014. Synthesis of mono- and dihydroxylated amino acids with new  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases: Biocatalytic oxidation of C-H bonds. *ChemCatChem* **6**:3012–3017.
- Baumann M, Stürmer R, Bornscheuer UT. 2001. A high-throughput-screening method for the identification of active and enantioselective hydrolases. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**:4201–4204.
- Bordes F, Cambon E, Dossat-Létisse V, André I, Croux C, Nicaud JM, Marty A. 2009. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site. *ChemBioChem* **10**:1705–1713.
- Botta M, Cernia E, Corelli F, Manetti F, Soro S. 1997. Probing the substrate specificity for lipases. II. Kinetic and modeling studies on the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1337**:302–310.
- Bouisset M, Radisson J. 1991. Process for preparing phenylacetic derivatives of thienopyridines and intermediates alpha-bromo-phenylacetic acids.
- Cambon E, Piamtongkam R, Bordes F, Duquesne S, André I, Marty A. 2010. Rationally engineered double substituted variants of *Yarrowia Lipolytica* lipase with enhanced activity coupled with highly inverted enantioselectivity towards 2-bromo phenyl acetic acid esters. *Biotechnol. Bioeng.* **106**:852–859.
- Carvalho PDO, Contesini FJ, Ikegaki M. 2006. Enzymatic resolution of (R,S)-ibuprofen and (R,S)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources. *Brazilian J. Microbiol.* **37**:329–337.

- Chen S, Qian L, Shi B. 2007. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochem.* **42**:988–994.
- Cieśliński H, Białkowska A, Tkaczuk K, Długołęcka A, Kur J, Turkiewicz M. 2009. Identification and molecular modeling of a novel lipase from an antarctic soil metagenomic library. *Polish J. Microbiol.* **58**:199–204.
- Elend C, Schmeisser C, Leggewie C, Babiak P, Steele HL, Reymond J, Jaeger K, Streit R, Carballeira JD, Streit WR. 2006. Isolation and Biochemical Characterization of Two Novel Metagenome-Derived Esterases Isolation and Biochemical Characterization of Two Novel Metagenome-Derived Esterases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3637–45.
- Elend C, Schmeisser C, Hoebenreich H, Steele HL, Streit WR. 2007. Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (*R*)-ibuprofen esters. *J. Biotechnol.* **130**:370–377.
- Fernández-Álvarez E, Kourist R, Winter J, Böttcher D, Liebeton K, Naumer C, Eck J, Leggewie C, Jaeger KE, Streit W, Bornscheuer UT. 2010. Enantioselective kinetic resolution of phenylalkyl carboxylic acids using metagenome-derived esterases. *Microb. Biotechnol.* **3**:59–64.
- Gu QM, Chen CS, Sih CJ. 1986. A facile enzymatic resolution process for the preparation of (+)-*S*-2-(6-hethoxy-2-naphthyl)propionic acid (Naproxen). *Tetrahedron Lett.* **27**:1763–1766.
- Guérard-Hélaine C, De Berardinis V, Besnard-Gonnet M, Darii E, Debacker M, Debard A, Fernandes C, Hélaine V, Mariage A, Pellouin V, Perret A, Petit JL, Sancelme M, Lemaire M, Salanoubat M. 2015. Genome mining for innovative biocatalysts: New Dihydroxyacetone aldolases for the chemist's toolbox. *ChemCatChem* **7**:1871–1879.
- Guieysse D, Salagnad C, Monsan P, Remaud-Simeon M. 2003a. Lipase-catalyzed enantioselective transesterification toward esters of 2-bromo-tolylacetic acids. *Tetrahedron Asymmetry* **14**:317–323.
- Guieysse D, Salagnad C, Monsan P, Remaud-Simeon M, Tran V. 2003b. Towards a novel explanation of *Pseudomonas cepacia* lipase enantioselectivity via molecular modelling of the enantiomer trajectory into the active site. *Tetrahedron Asymmetry* **14**:1807–1817.
- Habibi Z, Mohammadi M, Yousefi M. 2013. Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. *Process Biochem.* **48**:669–676.
- Heinze B, Kourist R, Fransson L, Hult K, Bornscheuer UT. 2007. Highly enantioselective kinetic resolution of two tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis*. *Protein Eng. Des. Sel.* **20**:125–131.
- Henke E, Pleiss J, Bornscheuer UT. 2002. Supporting Information for “ Activity of lipases and esterases towards tertiary alcohols : New insights into structure- function relationships “:3211–3213.
- Hutt AJ, Caldwell J. 1984. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **9**:371–3.
- Ivancic M, Valinger G, Gruber K, Schwab H. 2007. Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. *J. Biotechnol.* **129**:109–122.
- Janes LE, Lowendahl a. C, Kazlauskas RJ. 1998. Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: Identifying active and enantioselective hydrolases. *Chem. - A Eur. J.* **4**:2324–2331.
- Kato K, Gong Y, Saito T, Kimoto H. 2000. Efficient preparation of optically active ketoprofen by *Mucor javanicus* lipase immobilized on an inorganic support. *J. Biosci. Bioeng.* **90**:332–334.

- Kim GJ, Choi GS, Kim JY, Lee JB, Jo DH, Ryu YW. 2002. Screening, production and properties of a stereospecific esterase from *Pseudomonas* sp. S34 with high selectivity to (*S*)-ketoprofen ethyl ester. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **17**:29–38.
- Kim MG, Lee EG, Chung BH. 2000. Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment. *Process Biochem.* **35**:977–982.
- Kim SU, Kim YJ, Choi SG, Yea CH, Singh RP, Min J, Oh BK, Choi JW. 2008. Direct immobilization of cupredoxin azurin modified by site-directed mutagenesis on gold surface. *Ultramicroscopy* **108**:1390–1395.
- Lafaquière V, Barbe S, Puech-Guenot S, Guieysse D, Cortés J, Monsan P, Siméon T, André I, Remaud-Siméon M. 2009. Control of lipase enantioselectivity by engineering the substrate binding site and access channel. *ChemBioChem* **10**:2760–2771.
- Lee KW, Bae HA, Lee YH. 2007. Molecular cloning and functional expression of *esf* gene encoding enantioselective lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of optically active (*S*)-flurbiprofen. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:74–80.
- Lee KW, Shin GS, Bae HA, Shin HD, Lee YH. 2004. Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. ES-1 excreting a lipase with high enantioselectivity for (*S*)-ketoprofen ethyl ester. *Biotechnol. Lett.* **26**:1639–1642.
- Lee WH, Kim K-J, Kim MG, Lee SB. 1995. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: Effects of organic cosolvents and temperature. *J. Ferment. Bioeng.* **80**:613–615.
- Liu YY, Xu JH, Wu HY, Shen D. 2004. Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen. *J. Biotechnol.* **110**:209–217.
- Long Z, Xu J, Zhao L, Pan J, Yang S, Hua L. 2007. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen **47**:105–110.
- Manetti F, Mileto D, Corelli F, Soro S, Palocci C, Cernia E, D'Acquarica I, Lotti M, Alberghina L, Botta M. 2000. Design and realization of a tailor-made enzyme to modify the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1543**:146–158.
- Mauleon D, Artigas R, Garcia ML, Carganico G. 1996. Preclinical and clinical development of dexketoprofen. In: . *Drugs*, pp. 24–46.
- Mohammadi M, Gandomkar S, Habibi Z, Yousefi M. 2016. One pot three-component reaction for covalent immobilization of enzymes: application of immobilized lipases for kinetic resolution of rac-ibuprofen. *RSC Adv.* **6**:52838–52849.
- Muralidhar R V., Chirumamilla RR, Ramachandran VN, Marchant R, Nigam P. 2002. Resolution of (*RS*)-Proglumide using Lipase from *Candida cylindraceae*. *Bioorganic Med. Chem.* **10**:1471–1475.
- Ng IS, Tsai SW. 2005. Hydrolytic resolution of (*R,S*)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester by *Carica papaya* lipase in water-saturated organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **89**:88–95.
- Ni Z, Zhou P, Jin X, Lin XF. 2011. Integrating In Silico and In vitro Approaches to Dissect the Stereoselectivity of *Bacillus subtilis* Lipase A toward Ketoprofen Vinyl Ester. *Chem. Biol. Drug Des.* **78**:301–308.
- Palm GJ, Fernández-Álvarez E, Bogdanović X, Bartsch S, Sczodrok J, Singh RK, Böttcher D, Atomi H, Bornscheuer UT, Hinrichs W. 2011. The crystal structure of an esterase from the hyperthermophilic microorganism *Pyrobaculum calidifontis* VA1 explains its enantioselectivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**:1061–1072.

- Park HJ, Choi WJ, Huh EC, Lee EY, Choi CY. 1999. Production of optically active ketoprofen by direct enzymatic esterification. *J. Biosci. Bioeng.* **87**:545–547.
- Piamtongkam R, Duquesne S, Bordes F, Barbe S, André I, Marty A, Chulalaksananukul W. 2011. Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipases (Lip1, Lip3, and Lip4) towards 2-bromo phenylacetic acid octyl esters controlled by a single amino acid. *Biotechnol. Bioeng.* **108**:1749–1756.
- Qian L-L, Chen S-X, Shi B-Z. 2007. Preparation of enantiopure (*R*)-flurbiprofen catalyzed by a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Biocatal. Biotransformation* **25**:29–34.
- Qin B, Liang P, Jia X, Zhang X, Mu M, Wang XY, Ma GZ, Jin DN, You S. 2013. Directed evolution of *Candida antarctica* lipase B for kinetic resolution of profen esters. *Catal. Commun.* **38**:1–5.
- Reignier T, de Berardinis V, Petit J-L, Mariage a, Hamzé K, Duquesne K, Alphand V. 2014. Broadening the scope of Baeyer-Villiger monooxygenase activities toward  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones: a promising route to chiral enol-lactones and ene-lactones. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**:7793–6.
- Rivera I, Mateos JC, Marty A, Sandoval G, Duquesne S. 2013. Lipase from *Carica papaya* latex presents high enantioselectivity toward the resolution of prodrug (*R,S*)-2-bromophenylacetic acid octyl ester. *Tetrahedron Lett.* **54**:5523–5526.
- Rondon M. R, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono, Kara A. Lynch BA, Macneil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM. 2000. Cloning the metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2541–2547.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In: . *Methods Mol. Biol.*, pp. 365–386.
- Sandström AG, Wikmark Y, Engström K, Nyhlén J, Bäckvall J-E. 2012. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**:78–83.
- Schulz T, Pleiss J, Schmid RD. 2000. Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: a quantitative model. *Protein Sci.* **9**:1053–62.
- Siódmiak T, Ziegler-Borowska M, Marszałł MP. 2013. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (*R,S*)-ibuprofen. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **94**:7–14.
- Tartoff K., Hobbs C. 1987. Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones. *Lab. Focus*.
- Tasse L, Bercovici J, Pizzut-serin S, Robe P, Tap J, Klopp C, Cantarel BL, Coutinho PM, Henrissat B, Monsan P, Remaud-simeon M, Leclerc M. 2010. Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes:1605–1612.
- Vergne-Vaxelaire C, Bordier F, Fossey A, Besnard-Gonnet M, Debard A, Mariage A, Pellouin V, Perret A, Petit JL, Stam M, Salanoubat M, Weissenbach J, De Berardinis V, Zapparucha A. 2013. Nitrilase activity screening on structurally diverse substrates: Providing biocatalytic tools for organic synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **355**:1763–1779.
- Wei T, Feng S, Mao D, Yu X, Du C, Wang X. 2013. Characterization of a new thermophilic and acid tolerant esterase from *Thermotoga maritima* capable of hydrolytic resolution of racemic ketoprofen ethyl ester. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **85-86**:23–30.
- Xi WW, Xu JH. 2005. Preparation of enantiopure (*S*)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. *Process Biochem.* **40**:2161–2166.

- Xin JY, Li S Ben, Chen XH, Wang LL, Xu Y. 2000. Improvement of the enantioselectivity of lipase-catalyzed naproxen ester hydrolysis in organic solvent. *Enzyme Microb. Technol.* **26**:137–141.
- Yoon S, Kim S, Park S, Hong E, Kim J, Kim S, Yoo TH, Ryu Y. 2014. Improving the enantioselectivity of an esterase toward (*S*)-ketoprofen ethyl ester through protein engineering. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **100**:25–31.
- Yoon S, Kim S, Ryu Y, Kim TD. 2007. Identification and characterization of a novel (*S*)-ketoprofen-specific esterase. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**:1–7.
- Yousefi M, Mohammadi M, Habibi Z. 2014. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **104**:87–94.
- Yu EY, Kwon M a., Lee M, Oh JY, Choi JE, Lee JY, Song BK, Hahm DH, Song JK. 2011. Isolation and characterization of cold-active family VIII esterases from an arctic soil metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**:573–581.
- Zhang YY, Liu JH. 2011. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (*R*, *S*)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochem. Eng. J.* **54**:40–46.
- Zhao LL, Xu JH, Zhao J, Pan J, Wang ZL. 2008. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochem.* **43**:626–633.
- Zhu S, Wu Y, Yu Z. 2005. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on a pH-sensitive support for enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J. Biotechnol.* **117**:397–401.

### 2.3.3. Conclusion de la publication

Plusieurs enzymes intéressantes ont été découvertes grâce à la méthode présentée dans cette publication que ce soit pour l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique mais surtout pour l'hydrolyse de l'éthyl kétoprofène. Cependant concernant la résolution de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique aucune enzyme avec une énantiosélectivité >200 et des conversions supérieures à 10 % n'a été découverte. Une bêta lactamase provenant de la bactérie *Silicibacter pomeroyi*, notée Lip27 possède une énantiosélectivité supérieure à 200 vis-à-vis de l'éthyl kétoprofène, avec une préférence pour l'énantiomère (*S*) et une activité spécifique de 0,31  $\mu\text{mol/h/mg}$ . L'enzyme la plus intéressante découverte dans la publication précédente est une carboxylestérase provenant de la bactérie *Alcanivorax borkumensis*, notée Lip9, possède une très bonne énantiosélectivité vis-à-vis de l'éthyl kétoprofène (>200) avec une énantio-préférence pour l'énantiomère (*R*), et une activité spécifique nettement supérieure à l'enzyme précédente de 6,91  $\mu\text{mol/h/mg}$ .

Une étude de la stabilité des enzymes révélées lors de cette étude devrait être menée pour confirmer leur potentialité. La biologie moléculaire pourrait être un outil pour améliorer les enzymes qui ne possèdent pas une énantiosélectivité supérieure à 200. De plus pour pouvoir comparer les performances des enzymes mises en évidence dans les deux publications il faudrait calculer l'activité spécifique des mutants de Lip2p.

## 2.4. Conclusion Chapitre II

Ce chapitre a présenté deux méthodologies permettant la découverte d'enzymes énantiosélectives pour la résolution des substrats d'intérêt.

- Pour l'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique deux mutants de Lip2p avaient déjà été mis en évidence : V232S (préférence pour l'énantiomère (*S*)) (Bordes et al., 2009) et D97A-V232F (préférence pour l'énantiomère (*R*)) (Cambon et al., 2010a). Le mutant V232S sera utilisé en CO<sub>2</sub>SC (cf Chapitre III) car il présente une meilleure vitesse de réaction.



- D'autre part pour l'hydrolyse de l'éthyl ibuprofène, CRL1 de *C. rugosa* est intéressante mais moins que le monomutant Lip2p V232A de *Y. lipolytica* car cette dernière est plus rapide (11 fois) pour une même énantiosélectivité ( $E > 200$ ).
- De plus pour l'hydrolyse de l'éthyl naproxène, CRL1 de *C. rugosa* possède aussi une énantiosélectivité suffisante mais c'est le mutant de Lip2p V235S qu'il faut retenir ( $E > 200$  et est 30 fois plus rapide).
- Enfin pour l'hydrolyse de l'éthyl kétoprofène, CRL1 possède une énantio-préférence pour l'énantiomère (*S*) et CRL4 pour l'énantiomère (*R*), toutes deux avec une énantiosélectivité  $> 200$  (et une vitesse de 0,006 et 0,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivement). Quant aux mutants de Lip2p de *Y. lipolytica*, Lip2p V235G et V232S présentent une énantiosélectivité accrue par rapport à l'enzyme sauvage (10 fois) mais  $E < 200$  et possèdent une énantio-préférence pour l'énantiomère (*S*). Le mutant V232F quant à lui possède une énantiosélectivité  $> 200$  et une énantio-préférence pour l'énantiomère (*R*).

La bêta lactamase provenant de la bactérie *Silicibacter pomeroyi*, notée Lip27 possède une énantiosélectivité supérieure à 200 vis-à-vis de l'éthyl kétoprofène, avec une préférence pour l'énantiomère (*S*) et une activité spécifique de 0,31  $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{mg}$ .

La carboxylestérase provenant de *Alcanivorax borkumensis*, notée Lip9 dans la publication a une vitesse initiale de 6,91  $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{mg}$  et possède une énantiosélectivité (*R*)  $> 200$  vis-à-vis de l'éthyl kétoprofène.

Ainsi dans ce chapitre des enzymes possédant une énantiosélectivité supérieure à 200 ont été mises en évidence vis-à-vis de tous les substrats d'intérêt. La même stratégie d'amélioration de l'énantiosélectivité par biologie moléculaire pourrait être employée pour les enzymes Lip1, 11, 14, 22, et Lip26 du paragraphe 2.3.2 de la seconde publication pour obtenir une meilleure énantiosélectivité. De plus une caractérisation de ces nouvelles enzymes devra être menée pour confirmer de leur potentialité.

Le chapitre suivant présente la mise en œuvre en réacteur du mutant Lip2p V232S pour la résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique dans un solvant original : le  $\text{CO}_2$  supercritique.

# **Chapitre III : Résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique**



## Chapitre III : Résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique

### 3.1. Introduction Chapitre III

Le chapitre précédent a présenté la recherche d'enzymes énantiosélectives pour les quatre substrats d'intérêt identifiés pour ce travail. Ce chapitre va considérer la mise en œuvre d'une de ces enzymes, la lipase Lip2p V232S provenant de *Yarrowia lipolytica*, en mettant en œuvre un solvant original, le CO<sub>2</sub> supercritique, en substitution du décane. Pour cette étude nous avons naturellement choisi d'utiliser l'enzyme Lip2p V232S et le substrat pour lequel elle possède une énantiosélectivité infinie, l'acide 2-bromo phényl acétique ou l'ester octylique associé (Bordes et al., 2009). Parmi tous les enzymes et mutants testés, cette enzyme est en effet celle qui a donné les meilleurs résultats en termes d'activité et d'énantiosélectivité. Nous avons présenté dans le Chapitre I : 1.5 tout l'intérêt d'envisager l'utilisation du CO<sub>2</sub>SC. Le point critique du CO<sub>2</sub> est 31 °C et 74 bar lorsqu'il est pur, ces conditions sont dépendantes de la composition du mélange. Ainsi dans certains cas le CO<sub>2</sub> ne sera pas sous forme supercritique mais plutôt proche sur supercritique, le terme supercritique sera tout de même employé par la suite. Cependant, rappelons que les expérimentations du Chapitre II, ont été réalisées avec des réacteurs de type « tube Eppendorf » de 2 mL sur un agitateur de type vortex. Pour réaliser les expérimentations avec du CO<sub>2</sub>SC, l'appareillage disponible au laboratoire est un réacteur haute pression de 90 mL muni d'un système d'agitation par mobile tournant et d'un préleveur d'échantillon sous haute pression (d'un volume maximal de 2,5 mL), le mécanisme de chauffage est une coque chauffante permettant le maintien en température du réacteur (cf Figure 29).

Les expérimentations en décane ont été répétées en utilisant le même dispositif expérimental pour réaliser une comparaison efficace des procédés en solvant décane et en CO<sub>2</sub>SC. L'utilisation d'un réacteur de 90 mL apporte une certaine représentativité des contraintes rencontrées dans les conditions industrielles telle que l'influence de différents mobiles d'agitation. En revanche son utilisation implique des quantités relativement élevées d'enzyme et de substrat, ce qui a nécessité de très nombreuses cultures de levure (*Y. lipolytica*) et de synthèses de substrats, ce qui a entraîné une certaine variabilité entre les expérimentations.

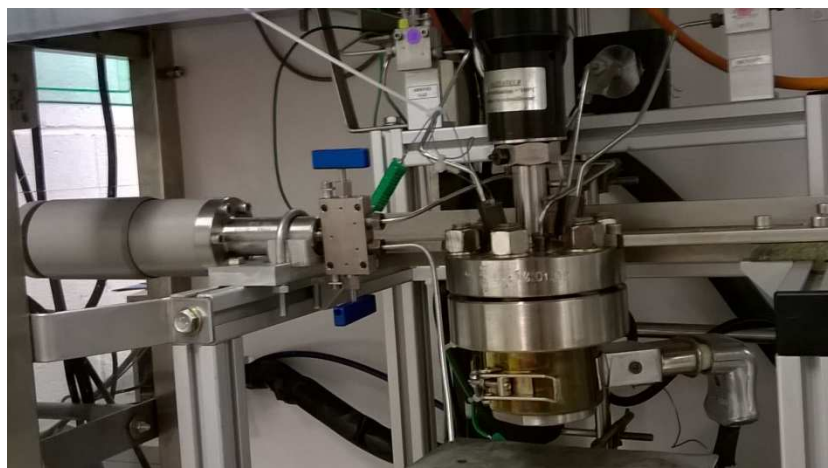


Figure 29 : Montage expérimental, appareillage sous haute pression  
Réacteur de 90 mL, préleveur, système de chauffage (coque chauffante) et agitateur













Dans le cas de la mise en œuvre d'enzymes en système monophasique ( $\text{CO}_2\text{SC}$  ou solvant organique) l'enzyme est immobilisée dans un solide poreux (cf 1.2.4). C'est le cas de nombreuses lipases commerciales comme le Novozyme 435 ou Lipozyme. Dans ce genre de systèmes la réaction mise en œuvre est une estérification et non une hydrolyse, car il est nécessaire d'utiliser de l'eau, pratiquement insoluble dans de tels milieux, pour effectuer une hydrolyse (c'est un substrat de la réaction). Dans un premier temps l'utilisation de l'enzyme sous forme immobilisée dans le système monophasique décane pour l'estérification du produit d'intérêt a été étudiée. L'enzyme Lip2p de *Y. lipolytica* n'étant pas une enzyme commerciale, ni sous forme libre ni sous forme immobilisée, un travail préalable de recherche de support permettant l'immobilisation a été effectué (cf paragraphe 3.2.1 suivant).

Rappelons que le but de la réaction mise en jeu est de permettre une séparation énantiomérique, et que, dans cet objectif, on peut indifféremment réaliser une hydrolyse ou une estérification (ou une autre réaction). Dans un contexte plus large de synthèse organique par voie enzymatique, ce degré de liberté n'existe pas.

Plusieurs configurations possibles sont étudiées pour la résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique ou l'ester octylique associé, cf Tableau 6. La partie 3.2 traite de l'étude de l'estérification en milieu monophasique du produit sous forme acide, l'acide 2-bromo phényl acétique. La mise au point de la réaction n'ayant pas encore été étudiée à ce stade, nous avons commencé par effectuer les expériences en tube Eppendorf (2 mL) en milieu solvant décane.

Les paragraphes 3.3 et 3.4 quant à eux traitent de l'hydrolyse du produit sous forme ester, l'ester octylique de l'acide 2 bromo phényl acétique, en système diphasique (*phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* par la suite). En effet, dans le cas de l'hydrolyse, l'eau étant un réactif, il n'est pas possible d'effectuer d'hydrolyse en milieu monophasique décane du fait des faibles solubilités mutuelles de ces composés. La mise au point de la réaction (hydrolyse de l'ester en système diphasique *phase aqueuse/décane*) a déjà été effectuée en tube Eppendorf lors de la recherche d'enzymes énantiosélective vis-à-vis du substrat. Les expériences en réacteur de 90 mL ont donc pu être directement menées, d'abord avec le décane puis avec le CO<sub>2</sub>SC avec le mutant V232S de la lipase Lip2p de *Yarrowia lipolytica* et la lipase de *Candida rugosa*.

**Tableau 6 : Expérimentations étudiées de ce chapitre**  
**Résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique ou l'ester octylique associé par Lip2p V232S de *Y. lipolytica***

Solvant apolaire	Décane				CO <sub>2</sub> SC	
	Tube Eppendorf 2 mL		Réacteur 90 mL		Réacteur 90 mL	
Type réacteur Nombre phases (solvant)	Monophasique	Diphasique	Monophasique	Diphasique	Monophasique	Diphasique
Estérification	 3.2.2					
Hydrolyse		 1.4.6 (Littérature)		 3.3		 3.3



Configuration étudiée



Configuration non étudiée



Configuration non envisageable, nécessité d'eau pour effectuer une hydrolyse et l'eau n'est pas soluble dans le décane

### 3.2. Estérification de l'acide 2-bromo phényl acétique par Lip2p V232S de *Yarrowia lipolytica* en système monophasique décane

Avant de pouvoir tester l'estérification de l'acide 2-bromo phényl acétique, la recherche de supports et l'optimisation des conditions d'immobilisation ont été étudiées.

### 3.2.1. Immobilisation

#### 3.2.1.1. Composition des supports solides

Dans le cadre de cette étude, 17 supports différents ont été testés, 7 provenant du fournisseur Purolite (Purolite © Lifetech Europe, Paris, France), 8 provenant du fournisseur SPRINBeads de SPRIN Technologies (Trieste, Italy) et 2 provenant du fournisseur Accurel© (Membrana GmbH, Wuppertal, Germany). Les références de ces supports sont rassemblées dans le Tableau 7.

Comme cela a été présenté dans le Chapitre I paragraphe 1.2.4 les méthodes d'immobilisation pour la lipase de *Y. lipolytica* ont été répertoriées dans un article de revue (Brígida et al., 2014). Nous avons choisi de reprendre le support Accurel©MP1000, bien caractérisé (Salis et al., 2003), déjà utilisé pour l'immobilisation de la lipase (Casas-Godoy et al., 2013; de Oliveira et al., 2006) qui offre une très bonne stabilité de l'enzyme (activité >90 % après un mois à 25 °C).

Tableau 7 : Liste des références des supports testés pour l'immobilisation de Lip2p V232S

Supports SprinTechnologies	Supports Purolite	Supports Accurel
A110	1504	MP1000
AA130	1604	MP1004
AE110	4204F	
AE130	8205F	
AH110	8214F	
AO110	8310F	
H130	8405F	
SN110		

Le mode opératoire de sélection des supports a été le suivant : les différents supports sont mis en contact avec le surnageant de culture et lentement agités à 4 °C pendant 72 h. On mesure alors grâce à un test *p*NPB, l'activité des enzymes restant dans le surnageant (cf Figure 30, Matériel et Méthode de la publication présentée dans le Chapitre II paragraphe 2.3.2). Ainsi, cinq supports ont été sélectionnés qui présentaient une activité significativement réduite dans le surnageant, preuve qu'une quantité significative d'enzyme avait pu être immobilisée. Le protocole d'immobilisation est présenté dans le prochain paragraphe (3.2.1.2). La composition des cinq supports sélectionnés est présentée dans le Tableau 8.

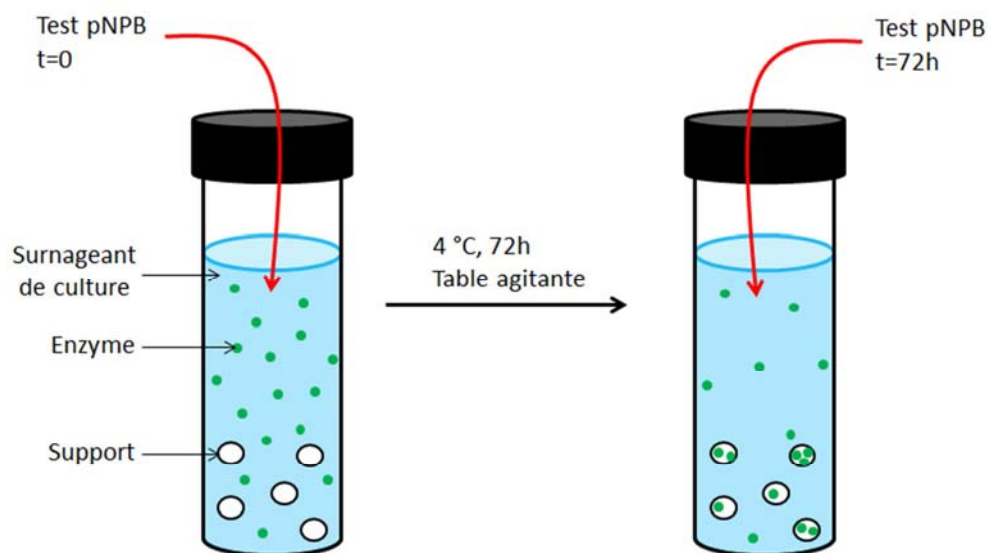


Figure 30 : Principe de l'immobilisation et de détermination de la quantité d'enzyme immobilisée

Tableau 8 : Composition des cinq supports testés pour l'immobilisation de Lip2p V232S

Nom du support	Composition	Groupe fonctionnel	Surface (m <sup>2</sup> /g)	Diamètre de pores (Å)	Taille particules (µm)
<sup>a</sup> MP1000	polypropylène	-	80-100	50-500	<1000
<sup>a</sup> MP1004	polypropylène	-	-	-	<500
<sup>b</sup> ECR8214	polyacrylique	époxy méthacrylate	>60	1200-800	150-300
<sup>b</sup> ECR1604	Styrène	quaternaire amine	-	-	300-1200
<sup>c</sup> AA130	polyacrylique	amine	40-60	400-600	-

<sup>a</sup>Accurel© (Membrana GmbH, Wuppertal, Germany)

<sup>b</sup>Purolite © Lifetech Europe (Paris, France)

<sup>c</sup>SPRINBeads de SPRIN Technologies (Trieste, Italy)

En outre, ces supports représentaient différents types d'immobilisation : adsorption physique (Accurel © MP1000), liaison covalente (Purolite ECR 8214) et liaison ionique (Purolite ECR 1604).

### 3.2.1.2. Protocole d'immobilisation

Dans le cas des supports de type Accurel<sup>®</sup> MP, le support doit être activé avant de pouvoir être utilisé pour l'immobilisation de l'enzyme. Pour ce faire il faut le mélanger avec de l'éthanol (10 mL d'éthanol / g de support) à température ambiante pendant 30 min. Puis, 10 mL d'eau / g de support sont ajoutés et la solution est mélangée pendant 30 min. Le support est filtré et lavé trois fois avec 50 mL d'eau. Enfin, le support est séché sous vide, cf Figure 31.





Figure 31 : Méthode d'activation des supports de type Accurel® MP

Afin de déterminer les conditions optimales pour maximiser la quantité d'enzyme chargée sur le support, deux paramètres ont été étudiés, le rapport « quantité d'enzyme / quantité de support » et la durée du contact ont été étudiés pour l'ensemble des 5 supports sélectionnés pour cette étude.

Le support, en contact avec la solution d'enzyme, a été agité horizontalement à 4 ° C pendant 96 h, l'activité résiduelle dans le surnageant a été mesurée toutes les 24 h (par un test *p*NPB déjà présenté dans le paragraphe Matériel et Méthodes de la publication du Chapitre II paragraphe 2.3.2), cf Figure 30. Par la suite, le support portant l'enzyme a été filtré de la solution enzymatique et séché sous vide. Enfin, l'activité de l'eau ( $a_w$ ) de la lipase immobilisée a été fixée à 0,52. Pour ce faire un protocole d'équilibrage simple consiste à placer l'enzyme immobilisée dans une enceinte fermée dans laquelle l'atmosphère possède une  $a_w$  donnée, cette atmosphère est obtenue grâce à une solution saturée en sels. Pour une  $a_w$  de 0,52 la solution saline préconisée est le  $Mg(NO_3)_2$ , l'enzyme est laissée à 4 ° C, pendant 72 h afin que l'équilibre se produise (cf Figure 32). Cette valeur de  $a_w$  a été choisie car il s'agit de la valeur optimale déterminée pour d'autres lipases homologues à Lip2p (Casas-Godoy et al., 2014). L'enzyme immobilisée est stockée à 4 ° C jusqu'à utilisation.

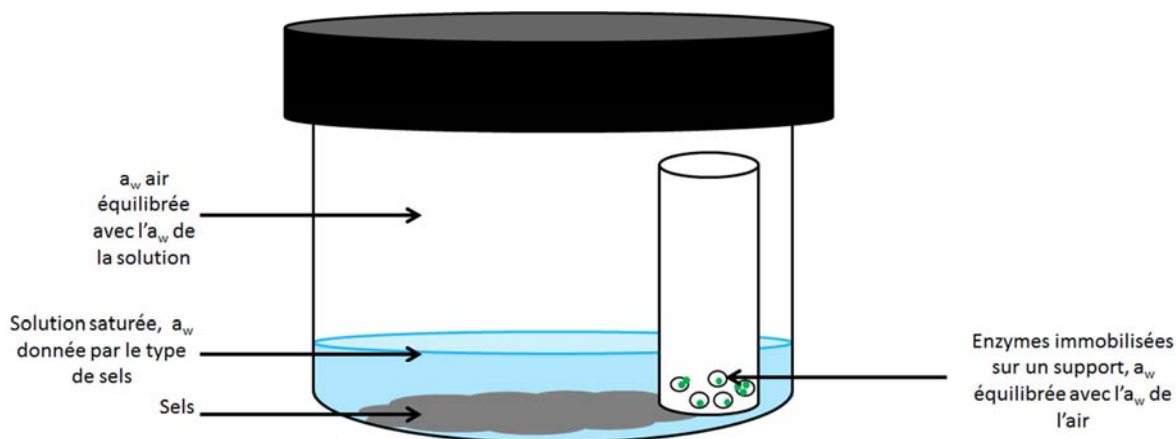


Figure 32 : Equilibrage de l' $a_w$  de l'enzyme immobilisée

Les unités d'enzyme (U) immobilisées sur les supports sont estimées en mesurant l'activité résiduelle du surnageant en contact avec le support lors du procédé d'immobilisation (Équation 2) :

Équation 2 : Calcul de l'activité théorique de l'enzyme immobilisée

$$\text{Activité enzyme immobilisée (U/g support)} = \frac{U_A - U_B}{\text{masse de support (g)}}$$

où :

$U_A$  : unité d'enzyme contenue dans le surnageant avant immobilisation

$U_B$  : unité d'enzyme contenue dans le surnageant pendant ou après le procédé d'immobilisation

Ces unités d'activité enzymatique sont mesurées à l'aide d'un test *p*NPB déjà présenté dans la publication du Chapitre II paragraphe 2.3.2.

### 3.2.1.3. Optimisation des conditions d'immobilisation

Une série d'expériences a été réalisée afin de trouver les conditions qui maximisent la quantité d'enzyme immobilisée sur les différents supports. A la fois, la valeur du temps de contact entre la solution contenant l'enzyme et du rapport quantité d'enzyme / support placé lors de l'immobilisation doivent être explorés afin d'assurer un chargement maximal de l'enzyme sur les supports. A cet effet, l'immobilisation a été effectuée en utilisant des rapports enzyme / support allant de 0,30 à 3,60 U / mg de support, et l'activité résiduelle du surnageant a été mesurée à 24, 48, 72 et 96 h.

Les unités d'enzyme immobilisées sur les supports ont été calculées en utilisant l'Équation 2. En ce qui concerne le temps qui est nécessaire pour que le support soit saturé, pour toutes les expériences, l'activité enzymatique dans le surnageant est restée constante après 72 h pour tous les types de support indiquant ainsi leur saturation. Ceci est visible sur la Figure 33 relative au support ECR8214 Purolite.

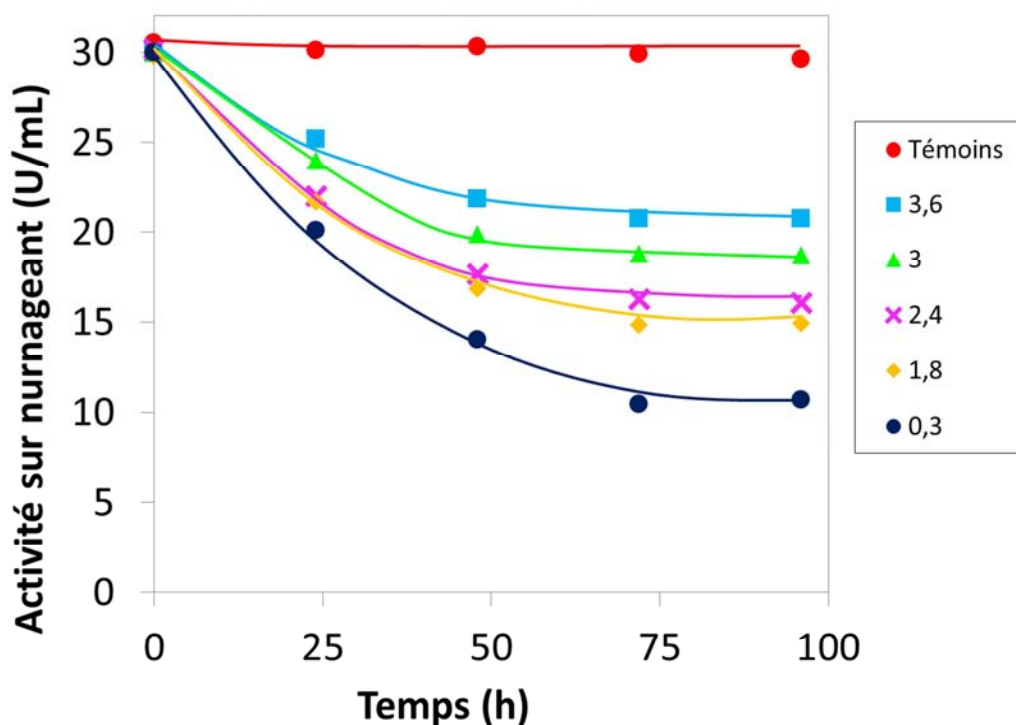


Figure 33 : Activité enzymatique restante (U/mL) dans le surnageant au cours du temps, lors de l'immobilisation, en fonction du ratio initial U d'enzyme/mg de support

Le support utilisé est Purolite® ECR 8214, l'immobilisation a été effectuée à 4 °C sur table agitante. Le test pNPB a été utilisé pour déterminer les activités enzymatiques, le test est effectué à pH7,2 et 25 °C, en microplaque. Les activités sont données en  $\mu\text{mol}$  de pNP libéré par minute et mL d'enzyme

La Figure 34 montre un maximum d'unités enzymatiques chargées sur les supports ( $t=72$  h), en fonction des unités enzymatiques par milligramme de support à l'instant initial. Cette activité a varié de 0,17 à 1,20 U / mg de support. Purolite ECR8214 et ECR1604 présentent les valeurs les plus élevées d'immobilisation ( $1,20 \pm 0,07$  et  $1,16 \pm 0,03$  U / mg de support, respectivement), suivis par le support Accurel © MP1000 ( $0,40 \pm 0,03$  UA / mg de support). La saturation des supports Purolite par l'enzyme est réalisée en utilisant un rapport enzyme / support de 2,4 U enzymatique / mg de support, tandis que pour les autres supports la saturation est obtenue avec 1,8 U / mg de support.

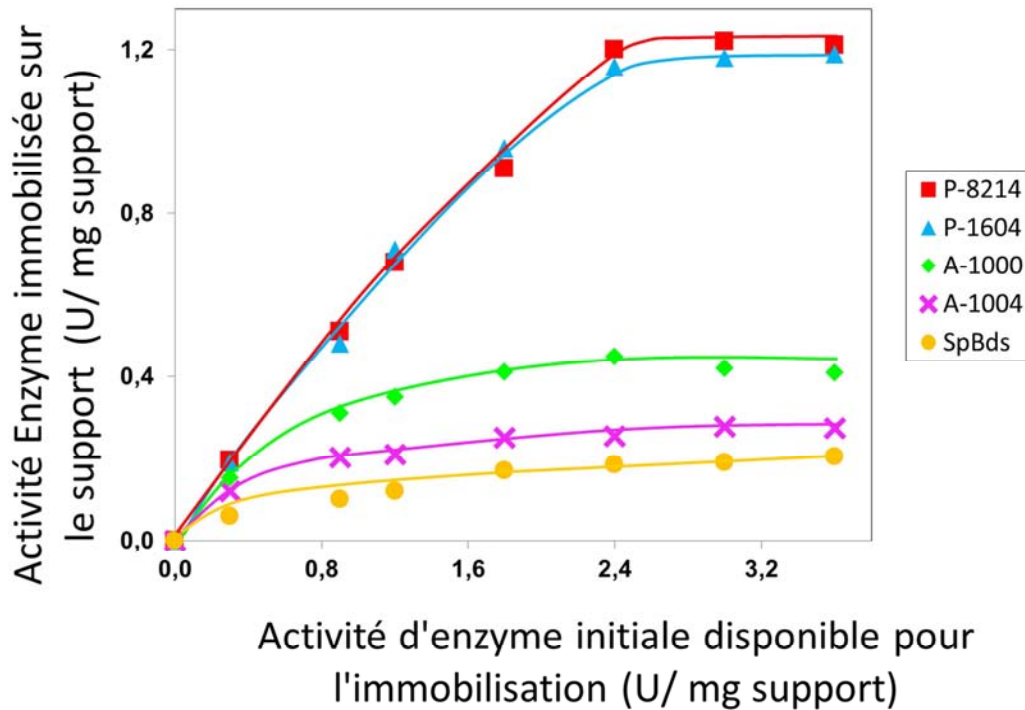


Figure 34 : Activité de l'enzyme (U) chargée sur différents supports en fonction du ratio initial U d'enzyme/mg de support. L'activité U d'enzyme chargée sur le support a été mesurée grâce à l'activité pNPB résiduelle du surnageant après 72 h, le test est effectué à pH7,2 et 25 °C, en microplaque. Les activités sont données en  $\mu\text{mol}$  de pNP libéré par minute et mL d'enzyme. Les supports étudiés sont Purolite ECR 8214, Purolite ECR 1604, Accurel MP 1000, Accurel MP 1004, SPRINbeads AA130

En conclusion pour obtenir les meilleurs taux d'immobilisation, il est conseillé d'effectuer le protocole pendant 72 h avec un rapport enzyme / support de 2,4 U enzymatique / mg de support pour les supports de type Purolite, tandis que pour les autres supports la saturation est obtenue avec 1,8 U / mg de support.

### 3.2.2. Réaction d'estérification avec l'enzyme immobilisée

L'estérification de l'acide 2-bromo phényl acétique (cf Figure 35) a été testée avec 3 supports différents (Purolite 8214, Purolite 1604 et Sprinbeads AA 130) portant l'enzyme Lip2p V232S.

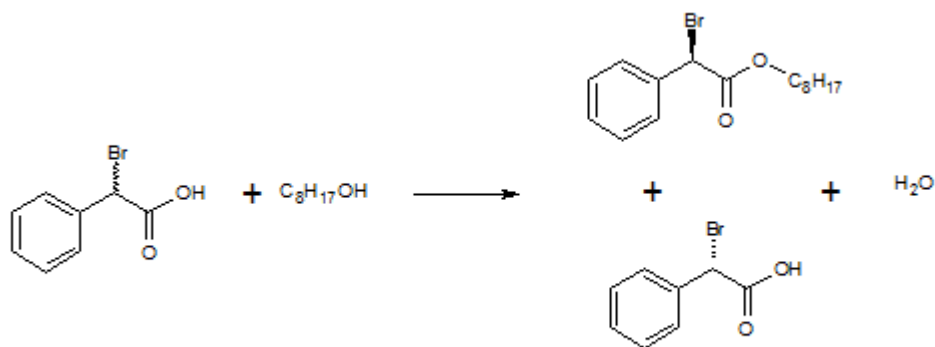


Figure 35 : Réaction d'estérification énantiosélective de l'acide 2-bromo phényl acétique

Deux molarités d'octane-1-ol ont été testées (100 ou 1000 mM) pour 50 mM d'acide, et dans tous les cas, moins de 5 % d'estérification ont été observés en 70 h de réaction (dans un tube Eppendorf de 2 mL avec un agitateur de type vortex).

L'utilisation de l'enzyme immobilisée en système monophasique décane pour l'estérification énantiosélective de l'acide 2-bromo phényl acétique n'a donc pas permis d'obtenir des taux de conversion élevés.

La réaction d'hydrolyse de l'ester octylique ayant déjà été mise au point lors de la recherche de l'enzyme et s'étant révélée satisfaisante du point de vue de des taux de conversion, l'étude de l'hydrolyse en système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* a donc été rapidement privilégiée.

### 3.3. Hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique par Lip2p de *Yarrowia lipolytica* (système diphasique *phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub> supercritique*)

#### 3.3.1. Introduction de la publication

L'estérification de l'acide 2-bromo phényl acétique n'ayant pas permis d'obtenir de forts taux de conversion (<5 %) probablement du fait de l'équilibre thermodynamique c'est tout naturellement que le choix s'est porté vers l'hydrolyse de l'ester (et plus précisément de l'ester octylique qui avait déjà été utilisé lors de la recherche de l'enzyme de la molécule). L'ester est soluble, au moins à 50 mM dans la phase organique, le décane à température ambiante (d'après nos mesures visuelles) et également dans la phase CO<sub>2</sub>SC (à 33 °C 120 bar,

cela a été démontré expérimentalement dans une cellule haute pression par observation visuelle). L'eau étant un substrat de la réaction mais n'étant pas soluble dans la phase décane le choix d'un système diphasique s'est imposé et permet de revenir à des conditions déjà étudiées lors de la recherche d'enzymes énantiosélectives dans les tubes Eppendorf (2 mL).

Ainsi le milieu réactionnel étudié est donc un système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* par comparaison au système *phase aqueuse/décane*. Nous avons vu dans le Chapitre I : 1.5.3.8 que ce genre de système diphasique *phase aqueuse/solvant* n'a pas été beaucoup étudié dans la littérature et la configuration utilisant le CO<sub>2</sub>SC a été très peu décrite (Harada et al., 2009; Hartmann et al., 2001; Holmes et al., 1998). En effet, dans le cas de l'utilisation du CO<sub>2</sub>SC plusieurs problématiques doivent être prises en considération et seront étudiées dans ce chapitre, à savoir :

- La baisse du pH de la phase aqueuse en contact avec du CO<sub>2</sub> sous pression (formation d'acide carbonique) voir Chapitre I : 1.5.3.8.2
- Une hydrodynamique diphasique différente due aux propriétés physico-chimiques particulières du CO<sub>2</sub>SC (viscosité, tension interfaciale...)
- Un partage des réactifs et produits différent par rapport au décane. En particulier, une solubilité de l'eau dans le CO<sub>2</sub>SC plus élevée par rapport aux très faibles valeurs observées dans les solvants très apolaires tel que le décane (Michor et al., 1996).

De plus toutes ces propriétés sont très dépendantes des conditions de température et de pression ce qui entraîne une très grande versatilité de ce système. Cependant, certaines problématiques peuvent être communes entre le système diphasique et le système monophasique en milieu CO<sub>2</sub>SC comme par exemple l'interaction directe entre le CO<sub>2</sub> et l'enzyme (formation de carbamates notamment, cf Chapitre I paragraphe 1.5.3.4) entraînant des modifications de la stabilité et de l'activité de cette dernière.

Cette étude a permis l'écriture d'une publication :

Resolution of 2-bromo-arylacetic acid ester by *Yarrowia lipolytica* lipase in water/supercritical CO<sub>2</sub> two-phase systems Cette publication a pour ambition d'étudier le système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* pour effectuer une hydrolyse énantiosélective.

Cette étude effectuée en comparaison avec le système diphasique *phase aqueuse/décane* habituel a permis d'améliorer le système en CO<sub>2</sub>SC mais également de comprendre les différences inhérentes à l'utilisation du CO<sub>2</sub>SC. La publication est l'objet du prochain paragraphe.

**3.3.2. Publication : Resolution of 2-bromo-arylacetic acid ester by *Yarrowia lipolytica* lipase in water/supercritical CO<sub>2</sub> two-phase systems**



## Resolution of 2-bromo-arylacetic acid ester by *Yarrowia lipolytica* lipase in water/supercritical CO<sub>2</sub> two-phase systems



Doriane Gérard<sup>a,b,c,d</sup>, Fiona Currie<sup>a</sup>, Yaocihuatl Medina Gonzalez<sup>a</sup>, Séverine Camy<sup>a</sup>, Alain Marty<sup>b,c,d</sup>, Jean-Stéphane Condoret<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Toulouse, INPT, UPS, Laboratoire de Génie Chimique UMR CNRS 5503, 4, Allée Emile Monso, F-31030 Toulouse, France

<sup>b</sup> Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31400 Toulouse, France

<sup>c</sup> INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 September 2016

Received in revised form

17 November 2016

Accepted 18 November 2016

Available online 23 November 2016

#### Keywords:

Supercritical carbon dioxide

Two-phase systems

Lipase

*Yarrowia lipolytica*

Enzymatic enantiomeric resolution

### ABSTRACT

A mutated lipase from *Yarrowia lipolytica* was used in *aqueous phase/scCO<sub>2</sub>* two-phase systems to perform the enzymatic resolution of (*R, S*) 2-bromophenyl acetic octyl ester. A solution of phosphate salt (1000 mmol/L) was added to buffer the aqueous phase in contact with CO<sub>2</sub> and resulting pH values around 6 were measured in a high pressure cell using a solvatochromic probe. Thus, an acceptable conversion rate and good enantioselectivity could be obtained but kinetics were shown to remain slower compared to an *aqueous phase/decane* two-phase system. Moreover, increasing pressure was shown to further slow-down the kinetics. This was hypothesized to be related to the mechanism of opening of the active site of the lipase which requires interfacial contact with a hydrophobic solvent phase. This condition is suspected not to be met in the case of scCO<sub>2</sub> in contact with an aqueous phase because the amount of water dissolved in the supercritical phase diminishes its hydrophobicity.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

$\alpha$ -substituted aryl and alkyl carboxylic acids are important intermediates encountered in synthetic pathways of numerous drugs, such as prostaglandin, prostacyclin, semi-synthetic penicillin and thiazolium salts. All these molecules contain an asymmetric carbon at the  $\alpha$  position of the carboxylic function, leading to the co-existence of two enantiomers. In most cases, only one enantiomer exerts the required biological activity. Recently, enzymatic resolution of 2-bromophenyl acetic octyl ester was proposed, using variant V232S of the lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*, taking advantage of the enzyme enantioselectivity [1–3]. Lipases are biocatalysts that are frequently used in liquid two-phase systems of the *aqueous phase/organic solvent* type, in this case decane as the organic phase. But such a process is impeded by the use of an organic solvent which contradicts the environmental benefit of using “natural” catalyst like enzymes. Therefore the replacement of the organic solvent by supercritical CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>) to propose a greener processes and to take advantage of the facilitated

post reaction separation is an attractive option. The usual procedure for using enzymes in scCO<sub>2</sub> has been to immobilize the enzyme on a porous solid support. In such cases, the reaction is carried out in what will be called here a single-phase system, *i.e.*, without an aqueous phase to solubilize the enzyme. In these systems, it was demonstrated that the control of the water activity in the system is crucial for the activity of the enzyme during synthesis reactions (esterification, transesterification, amidation. . .) [4–6]. Conversely, the use of scCO<sub>2</sub> in an *aqueous phase/scCO<sub>2</sub>* two-phase system has been rarely proposed [7,8], even though it allows the direct use of the enzyme and therefore eliminates the immobilization step. These studies [7,8] proved that the enzymatic reactions are possible in this kind of two-phase systems but they did not provide comparison with the conventional *aqueous phase/organic* two-phase system, which prevented assessment of the advantages or disadvantage of using scCO<sub>2</sub> in replacement of an organic solvent. Note that use of *water/scCO<sub>2</sub>* microemulsions was also described by in [9]. However, in this case surfactants were used and the reaction was studied for only 10 min, which was too short to assess a possible effect of the enzyme stability.

A specificity of the *water/CO<sub>2</sub>* two-phase system stands in the generation of carbonic acid in the aqueous phase, due to CO<sub>2</sub> partial solubilisation in water and the resulting chemical equilibria.

\* Corresponding author.

E-mail address: [jeanstephane.condoret@ensiacet.fr](mailto:jeanstephane.condoret@ensiacet.fr) (J.-S. Condoret).



Indeed, at high pressure (from 50 bar), the pH of aqueous phase is expected to decrease to around 3.2 at 32 °C [10]. This pH decrease is usually an important drawback for using enzymes because most of them are only active in a narrow range of pH values, generally close to neutral. Use of a buffered aqueous phase by addition of sodium bicarbonate was shown to improve the activity in the case of the asymmetric reduction of ketones catalysed by an alcohol dehydrogenase from *Geotrichum candidum*, where the yield of the reaction was improved when the pH was maintained to neutral [8].

The objective of this work is to achieve the enzymatic resolution of 2-bromophenyl acetic octyl ester (belonging to the 2-halogeno-carboxylic acids family) using *aqueous phase/scCO<sub>2</sub>* two-phase systems. In previous works, the *Yarrowia lipolytica* lipase was shown to be efficient for the resolution of this substrate and its enantioselectivity was improved using site-directed mutagenesis [2,3,11,12]. The mono-substituted variant V232S of the lipase from *Yarrowia lipolytica* (Lip2 V232S) was shown to exhibit enantioselectivity higher than 200, and thus provides purity compatible with pharmaceutical legislation, and was therefore used in this study. Indeed, only the (*S*) enantiomer is hydrolysed by the lipase, whereas the (*R*) enantiomer remains as an ester (Fig. 1). The resulting acid and ester can then be easily separated because their hydrophobicities are very different.

The objective of the study is thus to assess the feasibility of performing the resolution of 2-bromo phenyl acetic octyl ester in *aqueous/scCO<sub>2</sub>* two-phase systems. Also, the merits of using an *aqueous phase/scCO<sub>2</sub>* two phase system will be identified by comparison with the conventional *aqueous phase/decane* two-phase system.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical reagents and enzyme

Construction of Lip2 V232S by site-directed mutagenesis and its production were previously described [3]. The culture supernatant of *Yarrowia lipolytica*, containing the mutant of the lipase Lip2 V232S, is directly used as the catalytic phase for the resolution of the ester, with or without addition of adequate masses of salts (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) to buffer this aqueous phase. So this aqueous mixture containing the lipase Lip2 V232S will be referred here as “supernatant”. Peptone, tryptone and yeast extract necessary for the culture were purchased from Difco (Paris, France) and oleic acid was obtained from Prolabo (Fontenay sous Bois, France). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and used as received. Carbon dioxide was supplied by Air Liquid (purity around 99.98 %). Because only the racemic (*R, S*) 2-bromophenyl acetic acid was commercially available (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), it was necessary to synthesize the corresponding racemic octyl ester. The procedure for the preparation of the 2-bromophenyl acetic octyl ester was previously described [13].

### 2.2. Enzymatic hydrolysis of (*R, S*) 2-bromophenyl acetic octyl in buffered aqueous phase/decane two-phase systems performed in Eppendorf tubes

When there is no need to compare with *buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub>*, the experiments with decane were done in Eppendorf tubes. In this case 750 µL of culture supernatant containing the enzyme and 750 µL of racemic (*R, S*) 2-bromophenyl acetic octyl ester (50 mmol/L in decane) were mixed in a 2 mL Eppendorf tube. The tube was stirred in a vortex Genie 2 (D. Dutscher, Brumat, France) at 22 °C for at least 24 h. At regular time intervals (every 15 min, total of 6 samples of 50 µL), the progress of the reaction was

monitored by analyzing the organic phase composition after phase separation by centrifugation (dilution 10 fold in hexane) using HPLC as described in section 2.6.

### 2.3. Effect of the pH

In order to obtain a given value of the pH of the aqueous phase and to study effect of the pH on the enzyme activity, the culture supernatant of *Y. lipolytica* was 10 fold concentrated using centrifugal filter units (size of the filter 10 kD by Amicon® Ultra Centrifugal Filters, Merck Millipore). Then the concentrated enzyme was diluted by 10 using the adequate buffer. pH values of 3, 4, 5 and 6 were obtained using phosphate citrate buffer solution (500 mmol/L), pH values of 7 and 8 using phosphate buffer solution and pH values of 9 and 10 using carbonate buffer solution.

### 2.4. Enzymatic hydrolysis of (*R, S*) 2-bromophenyl acetic octyl ester in buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub> two-phase systems

In a 90 mL high pressure reactor (Top Industrie, France) (Fig. 2), 45 mL of culture supernatant containing the enzyme and 0.8 g of (*R, S*) 2-bromophenyl acetic octyl ester were added. Then scCO<sub>2</sub> was injected to the desired pressure, 80, 120 or 250 bar depending on the experiment, using a syringe pump (Teledyne ISCO 260D). Using the high pressure visualisation cell presented in the section 2.5, it was preliminarily checked that this amount of ester is totally soluble in scCO<sub>2</sub> at the conditions used in the reaction experiments. Reactor was stirred with several kinds of stirring devices (magnetic barrel, double rushton turbine, inclined blade impeller and gas dispersing turbine) at different rotation speeds (500 or 1600 rpm) at 35 °C for at least 24 h. Every hour, the progress of the reaction was monitored by analyzing the composition of the supercritical carbon dioxide phase after sampling of this phase (at least 6 samples of 0.5 mL per experiment) using a high pressure sampler (Top Industrie, France). 0.5 mL samples were taken and scCO<sub>2</sub> is re-injected using the high pressure pump (Teledyne ISCO 260D) to recover the initial value of the pressure which slightly decreased after sampling (a few bar).

The contents of the sampler were recovered and diluted using decane before HPLC analysis (Section 2.6). For comparison, in the conventional *buffered aqueous phase/decane* two-phase system, the same 90 mL reactor and same concentrations were used. The experiments were replicated twice.

To increase the concentration of the phosphate buffer (PO<sub>4</sub>) (from 100 mmol/L to 1000 mmol/L) adequate amounts of salts Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> were added to the culture supernatant that already contained 100 mmol/L of phosphate buffer.

### 2.5. Measurement of the pH of the aqueous phase/scCO<sub>2</sub> two-phase systems

The bromocresol purple coloured indicator was used to determine the pH of the aqueous phase in contact with high pressure CO<sub>2</sub>. A spectroscopic method was developed to accurately evaluate the colour change of the indicator in the aqueous phase as a function of CO<sub>2</sub> pressure. For these measurements, a StellarNet Incorporation EPP2000 light source and an Ocean Optics DH2000 spectrophotometer were coupled to a high-pressure view cell by optical fibres as shown in Fig. 3.

The absorption spectrum of the bromocresol dye at various pH is shown in Fig. 4 where it can be seen that the bromocresol purple is composed of two forms, one acid and one basic. These two forms absorb at different wavelengths (430 nm for the acid form and 590 nm for the basic form) [14].

It is possible to correlate the quotient of the two peak heights to the pH. A calibration curve was thus obtained by recording the

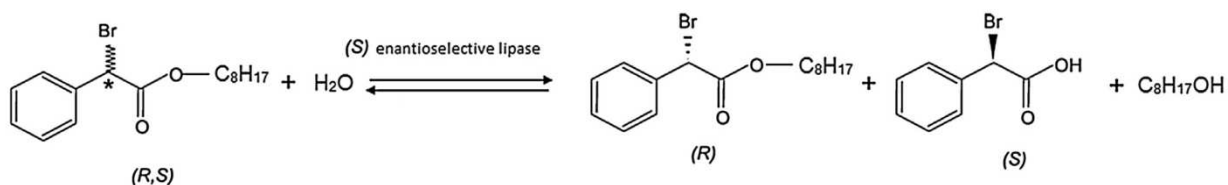


Fig. 1. Reaction scheme for the enzymatic resolution of 2-bromophenyl acetic octyl ester by enantioselective lipase hydrolysis.

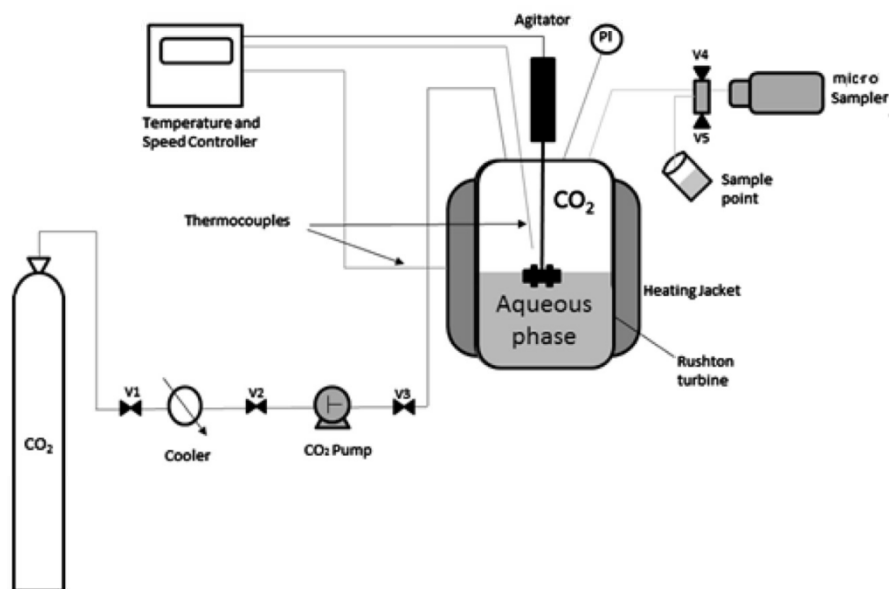


Fig. 2. Buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub> high pressure reactor.

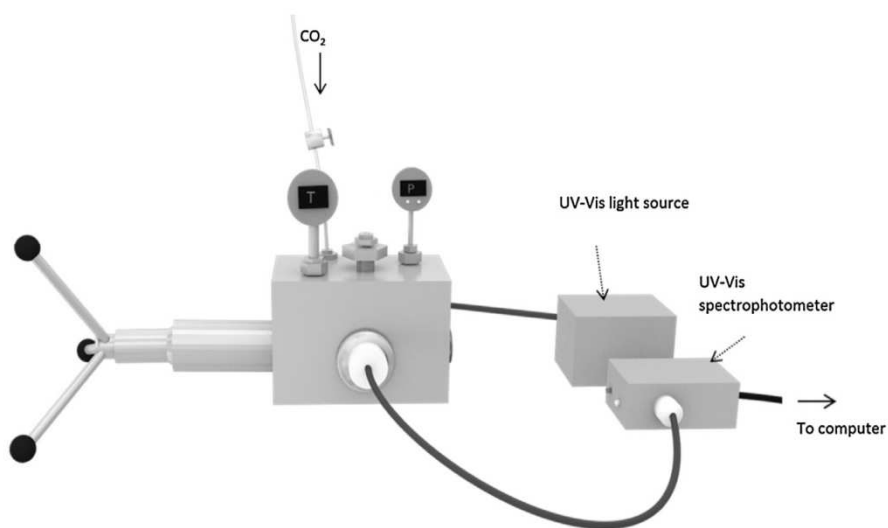


Fig. 3. Experimental set-up of spectroscopic apparatus combined with a high pressure cell.

absorbance of a solution of bromocresol purple in water at different pH values, the ration of the heights of the peaks obtained in these conditions were correlated to the pH (Fig. 5). This calibration curve was then used in pH measurements of *aqueous phase/scCO<sub>2</sub>* two-phase systems at different pressures both, in presence and in absence of buffer (section 3.2).

### 2.6. Chromatographic analysis

The HPLC device (Dionex, Ultimate 3000) was equipped with a chiral column: Chiralcel OJ-H (25 cm x 4.6 mm) (Chiral technologies Europe, Daicel group) connected to a UV detector (at 254 nm). The mobile phase was composed of a *n*-hexane/isopropanol mixture

[80:20 v/v] at a flow rate of 1.0 mL/min. Retention times were 6 and 7 min for the (*S*) and (*R*) enantiomers of the 2-bromophenyl acetic octyl ester, respectively.

### 2.7. Determination of the conversion rate

Conversion of the (*S*) enantiomer, which corresponds to the percentage of hydrolysis, is given by the following equation where *i* stands for initial time and *t* for final time.

$$\% \text{Hydrolysis} = 100 - \frac{[\text{concentration}(\text{S}) \text{ ester}]_t}{[\text{concentration}(\text{S}) \text{ ester}]_i} * 100$$

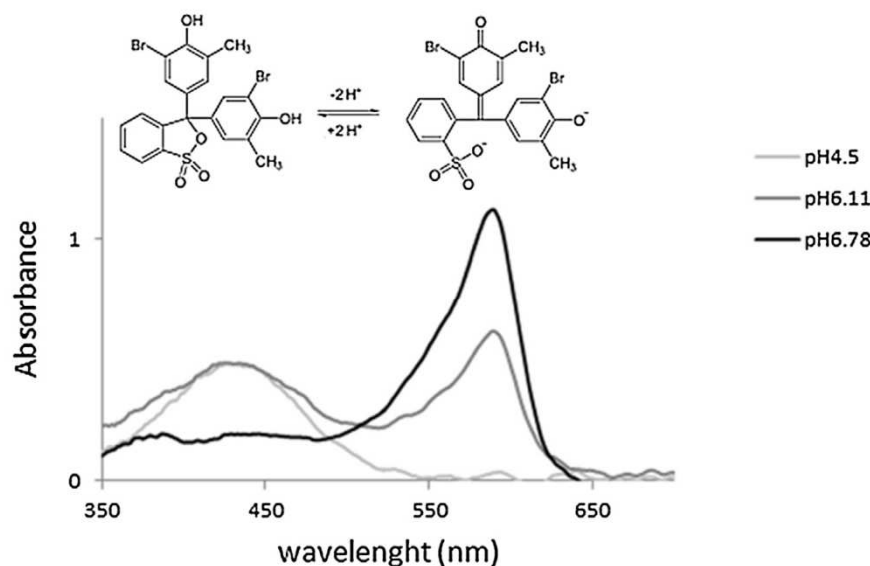


Fig. 4. UV/visible spectra of bromocresol purple at various pH in water at 35 °C.

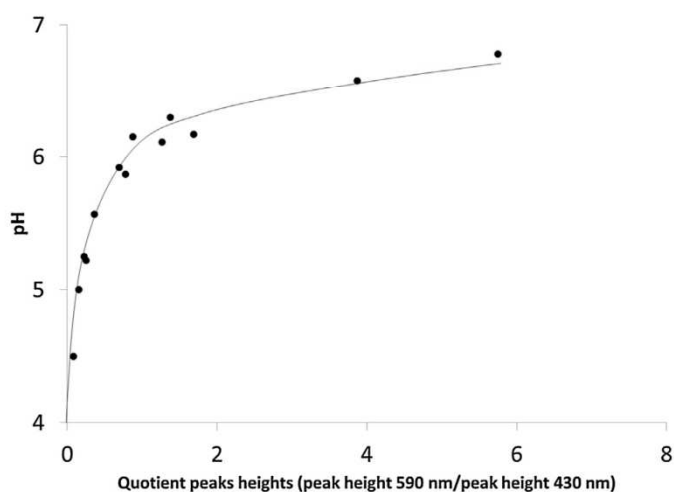


Fig. 5. Calibration curve of pH correlated to the quotient peaks heights of coloured indicator (Bromocresol purple).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Influence of the pH on the activity of Lip2 from *Yarrowia lipolytica*

It is well known that for a given enzyme there is corresponding optimal pH range. The optimal conditions for Lip2 from *Yarrowia lipolytica* were already described in previous studies [15–17] and were shown to lie between 5 and 9, depending on the authors and the lipase studied. It can be considered that the optimal pH conditions for the mono-mutant V232S are similar. To investigate the influence of the pH on enzyme activity, preliminary experiments were done in order to evaluate the initial velocity of the hydrolysis of 2-bromophenyl acetic octyl ester (dissolved in decane as the organic phase) using an aqueous phase containing the enzyme at different pH values. Initial velocity is evaluated as the initial slope of the curve % hydrolysis versus time and results are reported in Fig. 6. The initial velocity is clearly affected by the pH of the aqueous phase. Indeed, at pH = 5, the initial velocity is three fold lower than its optimum value at pH 7–8. These results demonstrate that the optimal pH for Lip2 V232S is comprised between 7 and 8 which is in agreement with the results given by Fickers et al. [15].

Table 1

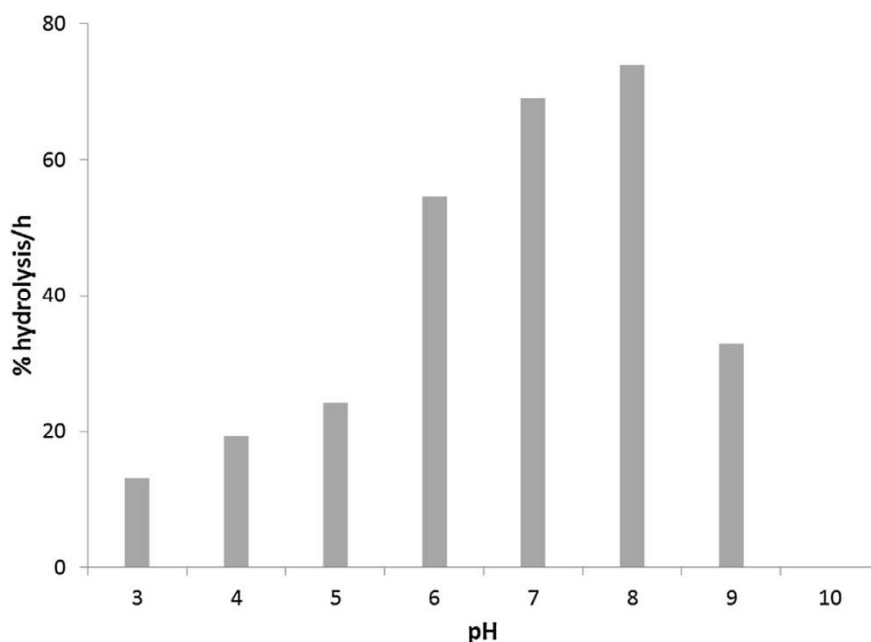
Experimental values of the pH of the aqueous phase in contact with scCO<sub>2</sub>, using different concentrations of phosphate buffer at 100 bar, 35 °C.

Phosphate buffer concentration in water (mmol/L)	Measured pH
100 (equivalent to broth supernatant)	<5
400	5
500	5.4
1000	5.9
1500	6.1

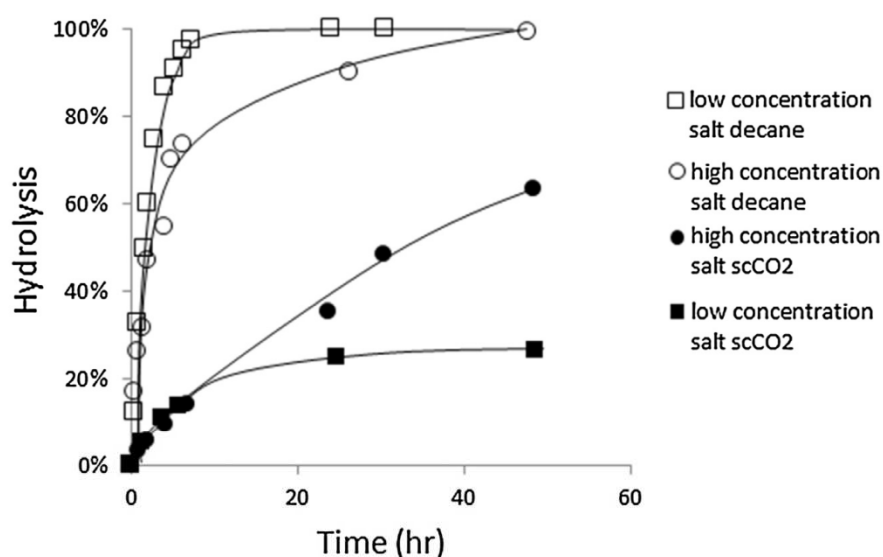
#### 3.2. Determination of the pH in the buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub> two-phase systems

As stated previously, the pH of an aqueous phase in contact with CO<sub>2</sub> is around 3.2 as soon as the pressure is greater than 50 bar [10] because of the formation of carbonic acid, as a consequence of the solubilisation of CO<sub>2</sub> in the aqueous phase. Because Lip2 V232S activity is highly affected at this pH value, it is necessary to buffer the aqueous phase to maintain a pH value around 7–8. The method and apparatus presented in section 2.5 were used to determine the value of pH in the aqueous phase, with and without salts at different concentrations, when in contact with scCO<sub>2</sub>; Values are given in Table 1. The Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> salts (phosphate buffer) were chosen to buffer the aqueous phase because they were already used for the culture of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Thus, after the culture growth, the phosphate buffer concentration of the supernatant containing the enzyme (Lip2 V232S) is about 100 mmol/L. However, it can be observed in Table 1 that, at this buffer concentration, the pH of the aqueous phase in contact with CO<sub>2</sub> at 100 bar and 35 °C was still lower than 5. A concentration of phosphate buffer of 1000 mmol/L was determined necessary to obtain pH values close to 6. Higher buffer concentrations did not lead to a significant increase in pH (6.1 at 1500 mmol/L). Stabilization of the pH in the buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub> two-phase system has already been studied [18–21] and improvement for the hydrolysis in biphasic water/scCO<sub>2</sub> system using sodium bicarbonate was proved [8]. Unfortunately these publications are not useful here because the phosphate buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) was not chosen.

Thus, it is possible to obtain a pH value of 6 with a 1000 mmol/L phosphate buffer. At this pH, the enzyme activity is 89 % of the maximum enzyme activity at pH 8 (Section 3.1). However high concentrations of salt are likely to be detrimental to enzyme activity.



**Fig. 6.** Initial velocity of the hydrolysis of (S) 2-bromophenyl acetic octyl ester using Lip2 V232S in the buffered aqueous phase/decane two-phase system (in same volumic ratio) obtained in Eppendorf tube (2 mL) at 22 °C.



**Fig. 7.** Influence of the concentration of salt (phosphate buffer) in two-phase systems with decane (35 °C) or with scCO<sub>2</sub> (120 bar, 35 °C). High concentration corresponds to 1000 mmol/L of PO<sub>4</sub> buffer and low concentration to 100 mmol/L in the aqueous phase. Reaction is the hydrolysis of 2-bromophenyl acetic octyl ester catalysed by Lip2 V232S from *Yarrowia lipolytica* using Rushton turbine at 1600 rpm.

Therefore influence of high salt concentrations on enzyme activity was investigated first.

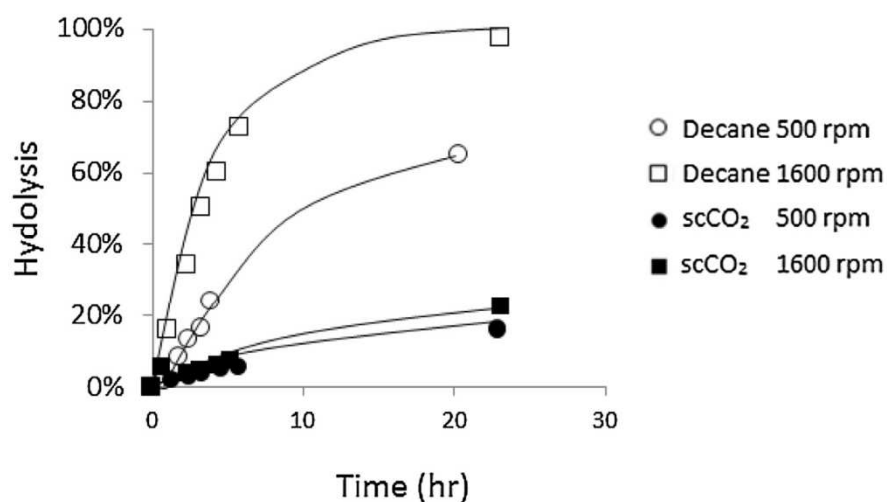
### 3.3. Influence of the concentration of salts in two-phase systems

For comparison, the influence of salt concentration was investigated in the conventional buffered aqueous phase/decane two-phase system using the same 90 mL reactor and same concentrations (salts and reactants) and temperature (35 °C) as in the buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub> two-phase system. Results for both systems at low (100 mmol/L pH < 5) and high (1000 mmol/L pH around 6) salt concentrations are compared in Fig. 7. In buffered aqueous phase/decane two-phase systems, it appears that a high concentrations of salt is not highly detrimental to enzyme activity. Indeed, only 25 % of activity are lost at 1000 mmol/L compared to the activity obtained at 100 mmol/L. In buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub>

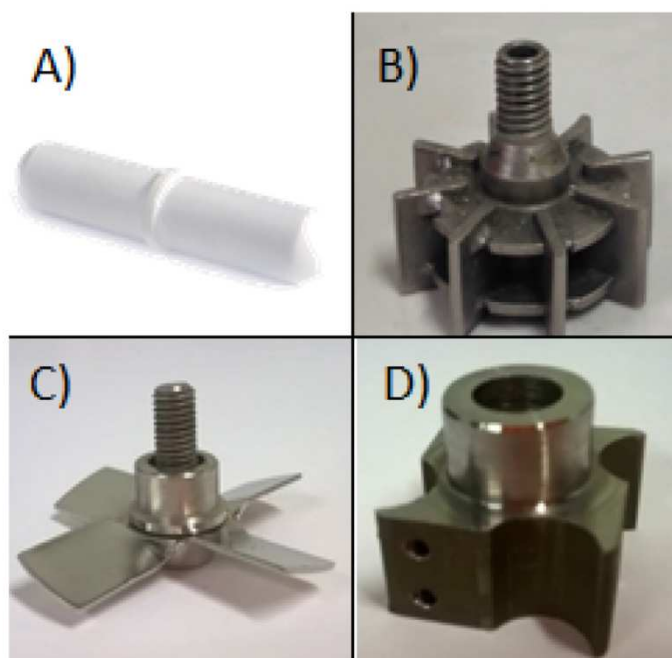
two-phase systems, it is confirmed that maintaining a pH around 6 (at 1000 mmol/L phosphate buffer) enables better kinetic performances to be obtained. At a low concentration of salt, and consequently low pH, it appears that the enzyme stability is reduced because the reaction stopped after 20 h. By comparing the initial slopes of the curves, initial kinetics are lower (10 fold) in scCO<sub>2</sub>, than in decane, even at high concentrations of salt (1000 mmol/L in the aqueous phase). This decrease of activity cannot be fully explained by the difference of pH, 7 in decane versus 6 in scCO<sub>2</sub>.

### 3.4. Influence of stirring conditions

In such two-phase liquid/liquid or liquid/fluid systems, using catalysts acting at the aqueous-organic interface, as is the case for lipases, the interfacial area and mass transfer between phases are



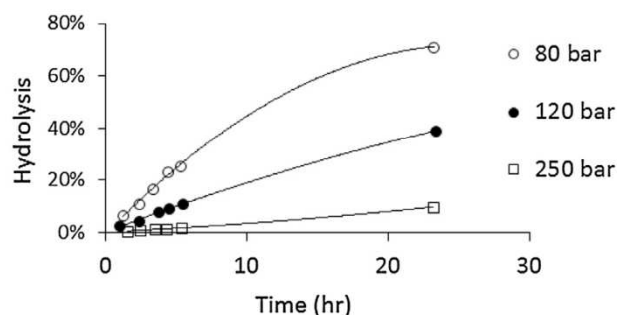
**Fig. 8.** Effect of the stirring speed (500 rpm or 1600 rpm) in buffered aqueous phase/decane (35 °C, 1000 mmol/L phosphate buffer) system or buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub> (35 °C, 120 bar, 1000 mmol/L phosphate buffer) system on the hydrolysis of (S) 2-bromophenyl acetic octyl ester by *Y. lipolytica* Lip2 V232S using a Rushton turbine.



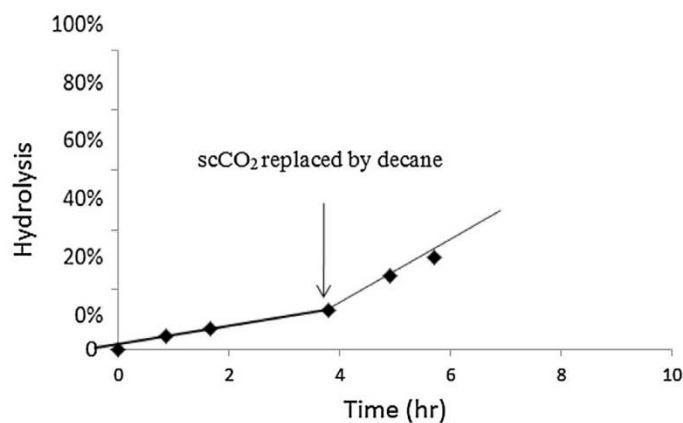
**Fig. 9.** Different stirring devices used in this work. A) magnetic barrel B) double Rushton turbine C) inclined blade impeller D) gas dispersing turbine.

expected to be a limiting parameters for the kinetics [22]. With the type of agitated reactor used in this study, impeller type and stirring speed are expected to have a significant effect on reaction performances. As a default stirring mobile, a double disk Rushton-type turbine was used to disperse organic phase (decane or scCO<sub>2</sub>) in the aqueous phase. Influence of stirring speed (500 and 1600 rpm which corresponds to maximum speed of the set-up) was evaluated in the case of decane and scCO<sub>2</sub> and kinetics are reported in Fig. 8.

In the case of decane, the results show a clear influence of the stirring speed on the kinetics while this influence is almost negligible in the case of scCO<sub>2</sub>. In the case of scCO<sub>2</sub>, four different types of stirring devices were tested at 1600 rpm, (magnetic barrel, double Rushton turbine, inclined blade impeller, gas dispersing turbine) (Fig. 9) but no significant difference was observed (data not shown). This tends to indicate that limited mass transfer is not the cause of the slow kinetics in this case.



**Fig. 10.** Influence of the pressure on the conversion rate in buffered aqueous/scCO<sub>2</sub> two-phase system for the hydrolysis of (S) 2-bromophenyl acetic octyl ester using *Y. lipolytica* Lip2 V232S (at 35 °C, 1000 mmol/L of phosphate buffer, using magnetic barrel).

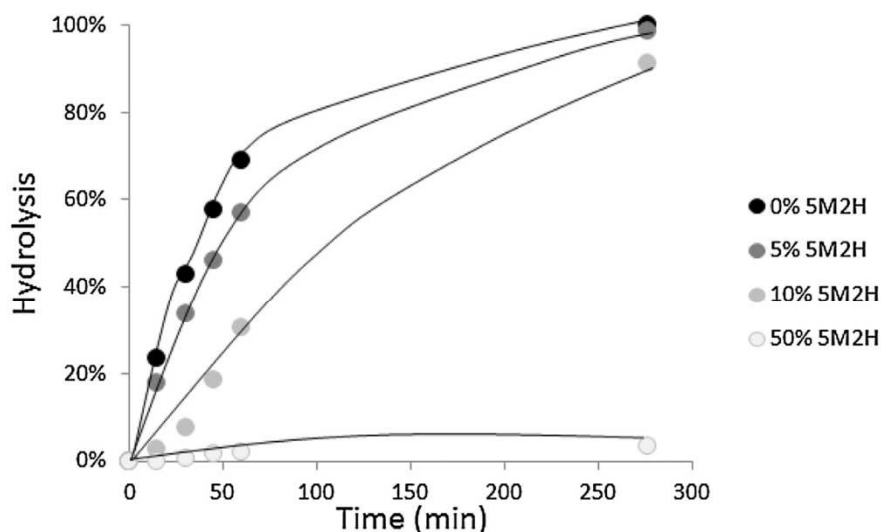


**Fig. 11.** Hydrolysis of (S) 2-bromophenyl acetic octyl ester by Lip2 V232S in buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub> (35 °C 120 bar) in a first stage and then replacement of scCO<sub>2</sub> by decane (35 °C) using a magnetic barrel.

### 3.5. Influence of the pressure

As usual in the case of supercritical fluid, it is interesting to assess the influence of the pressure. This was tested in the range 80–250 bar and results are presented in Fig. 10.

A noteworthy slowdown of the kinetics is observed in the system when the pressure is increased. The conversion after 24 h being decreased from 71 % at 80 bar to 10 % at 250 bar. It has been shown [10] that, in this range of pressure, the pH of the aqueous phase is only very weakly dependant of the CO<sub>2</sub> pressure, indicating that



**Fig. 12.** Effect of various molar proportion of 5M2H in decane on the hydrolysis kinetics of 2-bromophenyl acetic octyl ester. In aqueous phase/organic phase two-phase systems by *Y. lipolytica* Lip2 V232S at 22 °C in Eppendorf tube (2 mL).

pH effect is not the cause. Although mass transfer in the fluid phase is likely to be disfavoured at higher pressure (due to higher viscosity and lower diffusivity of the CO<sub>2</sub> phase) the order of magnitude of the observed effect is too high to be attributed to mass transfer phenomena. Up to now, the effect of pressure on enzyme activity is not clearly understood [23]. Indeed, some authors reported that a large change of pressure, and in consequence of density, could significantly alter the interaction of CO<sub>2</sub> with the enzyme by formation of carbamates, from reaction of CO<sub>2</sub> with the free amine groups present on the surface of the enzyme [7,18,24–31]. These carbamates could be responsible for charge removal of the histidine residues present at the active site of the enzyme, thus resulting in a decrease of its activity or even in its complete inactivation [29,32,33]. Kamat et al. [28] studied the effect of carbon dioxide on subtilisin by providing direct evidence of the formation of carbamate structures by using laser desorption mass spectroscopy (LD-MS). Ikushima et al. [34] used Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to monitor enzyme conformation in scCO<sub>2</sub> during esterification reaction. They showed a conformational change of the enzyme depending on the pressure.

Also, increase of pressure induces changes in the supercritical phase properties. Some authors reported the variation with pressure of the dielectric constant [18,27,35,36], or of the logP [31,37] in the case of sc-fluoroform or scCO<sub>2</sub> (log P is related to hydrophilicity of the organic phase). However there is weak influence of pressure on the dielectric constant in the case of scCO<sub>2</sub> [38] but an important influence on the density, which could increase the interaction of this fluid with the lipase, and have an effect on enzyme activity. Nevertheless, it is difficult to draw a conclusion around these possible causes.

Another hypothesis would be to relate the decrease of activity of the enzyme in respect to pressure with the state of active site of the enzyme. Indeed, it has been shown that the activity of most lipases is strongly correlated to the opening of a “molecular lid” located near the active site of the enzyme. The opening of the lid is a characteristic mechanism of lipases and is promoted in hydrophobic environments (organic phase) while its closing is induced in hydrophilic medium. This mechanism is responsible for the specific activation of most lipases at water-organic interfaces [39]. In monophasic system, where the detrimental effect of pressure was observed, the effect of CO<sub>2</sub> on the “lid” was also suggested [34,40]. Modification of supercritical phase hydrophobicity with the pressure could thus be suspected as an explanation for the observed

decrease of activity of the enzyme and is further investigated in section 3.7.

### 3.6. Study of the reversibility of the effect of scCO<sub>2</sub> use on lipase activity

In order to understand the influence of scCO<sub>2</sub> on enzyme activity, the experiment consisted in starting the reaction of hydrolysis in an buffered aqueous phase/scCO<sub>2</sub> two-phase system and then, after 4 h hydrolysis, to depressurize the system and replace scCO<sub>2</sub> by decane to run the reaction further. Clearly, (Fig. 11) an increase of the velocity is observed when the scCO<sub>2</sub> is replaced by decane, thus confirming an inhibiting effect of scCO<sub>2</sub> on the enzyme which is not permanent because activity is recovered after scCO<sub>2</sub> replacement. The effect of scCO<sub>2</sub> on immobilized *Yarrowia lipolytica* lipase was previously studied [32] in the case of esterification reaction of lauric acid. The authors evidenced that scCO<sub>2</sub> could affect this enzyme when in contact with scCO<sub>2</sub>. To explain this effect of scCO<sub>2</sub> on the lipase activity, the authors proposed two hypothesis: the formation of carbamates or the stripping effect of scCO<sub>2</sub> which extracts the “indispensable” water on the support. The effect of stripping cannot be evoked in our case because water quantity is not limiting in an aqueous phase/scCO<sub>2</sub> two-phase system.

### 3.7. Effect of the polarity of the solvent

As stated before in section 3.5, a possible explanation to the slowdown of kinetics when scCO<sub>2</sub> is used instead of decane could be a dysfunction of the “molecular lid” of the enzyme, due to the decrease of hydrophobic character of the CO<sub>2</sub> phase when pressure is increased. Indeed, because the supercritical phase is in contact with water, the thermodynamics of two-phase systems at equilibrium indicate that a pressure increase leads to a higher water content in that phase (at 32 °C, the solubility of water in CO<sub>2</sub> is changing from 1 g/L at 80 bar to 1.7 g/L at 250 bar [41,42]) inducing a change in the polarity of that phase. The influence of the change in polarity of the organic phase on the kinetics of hydrolysis were thus investigated by addition of several amounts (mole fraction ranging from 0 % to 100 %) of 5-methyl-2-hexanone (5M2H), an organic polar solvent, to decane.

Kinetic results are shown on Fig. 12 where the detrimental effect of increasing proportions of 5M2H in decane clearly appears. This result demonstrates that a polar organic phase is not favourable

to enzyme activity, which could explain poor hydrolysis performances obtained in scCO<sub>2</sub>, especially when pressure increases.

#### 4. Conclusion

This work attempted to bring deeper knowledge about the operation of two-phase enzymatic reactions using scCO<sub>2</sub> as the organic phase with enzyme dissolved in the aqueous phase. Use of two-phase systems for biocatalysis, especially with supercritical CO<sub>2</sub>, is scarce in the literature while this configuration is convenient because it does not require immobilization of the lipase, which remains solubilized in the aqueous phase. On the other hand the hydrophobic ester remains in the scCO<sub>2</sub> phase and is easily separated. The tested reaction was targeted to perform enantiomeric resolution of a racemic mixture of 2-bromophenyl acetic octyl ester. This was done by hydrolysis using a specific lipase from *Y. lipolytica*. The reaction was effective with high yields in this system and good enantiomeric excess was obtained, similar to what was obtained in the same configuration using decane as the organic phase. One expected difference highlighted in this study was related to the decrease of the pH of the aqueous phase in contact with pressurized CO<sub>2</sub>, because of the dissolution of this latter into the aqueous phase. As expected, use of a buffered aqueous phase was necessary to insure acceptable values of pH and to obtain good final conversion but, in all cases, kinetics were observed to be slower in the case of scCO<sub>2</sub>, as compared to decane. Better agitation did not improve the kinetics indicating that mass transfer or interfacial area were probably not the cause of slower kinetics. So, one proposed hypothesis was related to the specific mechanism of the “opening of the molecular lid” above the active site. This is a characteristic mechanism of lipases (and of our specific *Yarrowia lipolytica* lipase) which requires interfacial contact with a hydrophobic solvent phase. This condition is not always met in the case of scCO<sub>2</sub> in contact with an aqueous phase because the small amount of water dissolved in the supercritical phase could diminish its hydrophobicity. This hypothesis is mainly supported by the negative effect of a pressure increase on kinetics. In this case hydration of CO<sub>2</sub> is increased because the solubility of water in scCO<sub>2</sub> increases with pressure, and therefore its hydrophobicity is decreased. Such *aqueous phase/organic* two-phase systems for enzymatic reaction were not an often studied on the point of view of kinetic performances for the design of the reactor, especially with supercritical CO<sub>2</sub>. Significant work is still necessary to fully understand the specificity of the use of CO<sub>2</sub> in replacement of the organic solvent. Testing other types of reactions and other lipases would greatly help to draw generalizable conclusions. Nevertheless, one important objective of this work was to perform enzymatic enantiomeric resolution in an innovative configuration which potentially insures a production process meeting the principles of Green Chemistry. This objective was met because the enantiomeric performance of the chosen lipase was indeed maintained for the configuration using supercritical CO<sub>2</sub>, demonstrating the feasibility of the process for enzymatic resolution of racemates. Finally, although kinetics in scCO<sub>2</sub> proved to be slower and that addition of salts was necessary, comparison with decane must include the expected simplification of the post reactional separation when using scCO<sub>2</sub>, which was not considered here and which may give a decisive advantage to this type of process.

#### Acknowledgment

We thank the Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur de l'Université de Toulouse and the Région Midi-Pyrénées (France) for PhD grant of Doriane Gerard.

#### References

- [1] R. Piamtongkam, S. Duquesne, F. Bordes, S. Barbe, I. André, A. Marty, W. Whulalaksananukul, Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipases (Lip1 Lip3, and Lip4) towards 2-bromo phenylacetic acid octyl esters controlled by a single amino acid, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 1749–1756.
- [2] E. Cambon, R. Piamtongkam, F. Bordes, S. Duquesne, I. André, A. Marty, Rationally engineered double substituted variants of *Yarrowia lipolytica* lipase with enhanced activity coupled with highly inverted enantioselectivity towards 2-bromo phenyl acetic acid esters, *Biotechnol. Bioeng.* 106 (2010) 852–859.
- [3] F. Bordes, E. Cambon, V. Dossat-Létisse, I. André, C. Croux, J.M. Nicaud, A. Marty, Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site, *Chembiochem* 10 (2009) 1705–1713.
- [4] A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 212–216.
- [5] A. Marty, W. Chulalaksananukul, J.S. Condoret, R.M. Willemot, G. Durand, Comparison of lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane, *Biotechnol. Lett.* 12 (1990) 11–16.
- [6] A. Marty, W. Chulalaksananukul, R.M. Willemot, J.S. Condoret, Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO<sub>2</sub>, *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992) 273–280.
- [7] T. Hartmann, H.H. Meyer, T. Scheper, The enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-5-phenyl-4-pentenoic acid ethylester in supercritical carbon dioxide using lipases, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 653–660.
- [8] T. Harada, Y. Kubota, T. Kamitanaka, K. Nakamura, T. Matsuda, A novel method for enzymatic asymmetric reduction of ketones in a supercritical carbon dioxide/water biphasic system, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 4934–4936.
- [9] J.D. Holmes, D.C. Steytler, G.D. Rees, B.H. Robinson, Bioconversions in a Water-in-CO<sub>2</sub> microemulsion, *Langmuir* 14 (1998) 6371–6376.
- [10] B. Meyssami, M.O. Balaban, A.A. Teixeira, prediction of pH in model systems pressurized with carbon dioxide, *Biotechnol. Prog.* 8 (1992) 149–154.
- [11] M. Cancino, P. Bauchart, G. Sandoval, J. Nicaud, I. André, V. Dossat, A. Marty, A variant of *Yarrowia lipolytica* lipase with improved activity and enantioselectivity for resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters, *Tetrahedron: Asymmetry* 19 (2008) 1608–1612.
- [12] E. Cambon, R. Piamtongkam, F. Bordes, S. Duquesne, S. Laguerre, J.M. Nicaud, A. Marty, A new *Yarrowia lipolytica* expression system: an efficient tool for rapid and reliable kinetic analysis of improved enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 47 (2010) 91–96.
- [13] D. Guieysse, C. Salagnad, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, Lipase-catalyzed enantioselective transesterification toward esters of 2-bromo-tolylacetic acids, *Tetrahedron Asymmetry* 14 (2003) 317–323.
- [14] L. Van Der Schueren, T. Mollet, Ozgur Ceylan, K. De Clerck, The development of polyamide 6.6 nanofibres with a pH-sensitive function by electrospinning, *Eur. Polym. J.* 46 (2010) 2229–2239.
- [15] P. Fickers, A. Marty, J.M. Nicaud, The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 632–644.
- [16] A.I.S. Brígida, P.F.F. Amaral, M.A.Z. Coelho, L.R.B. Gonçalves, Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101 (2014) 148–158.
- [17] A. Aloulou, J.A. Rodriguez, D. Puccinelli, N. Mouz, J. Leclair, Y. Leblond, F. Carrière, Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*: *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids.* 1771 (2007) 228–237.
- [18] H.R. Hobbs, N.R. Thomas, Biocatalysis in supercritical fluids, in *flourous solvents, and under solvent-free conditions*, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2786–2820.
- [19] C. Roosen, M. Ansorge-Schumacher, T. Mang, W. Leitner, L. Greiner, Gaining pH-control in water/carbon dioxide biphasic systems, *Green Chem.* 9 (2007) 455–458.
- [20] K.J. Ziegler, J.P. Hanrahan, J.D. Glennon, J.D. Holmes, Producing pH switches in biphasic water-CO<sub>2</sub> systems, *J. Supercrit. Fluids.* 27 (2003) 109–117.
- [21] J.D. Holmes, K.J. Ziegler, M. Audriani Lee, P.A. Bhargava, D.C. Steytler, K.P. Johnston, Buffering the aqueous phase pH in Water-in-CO<sub>2</sub> microemulsions, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 5703–5711.
- [22] C. Nioi, D. Riboul, P. Destrac, A. Marty, L. Marchal, J.S. Condoret, The centrifugal partition reactor, a novel intensified continuous reactor for liquid-liquid enzymatic reactions, *Biochem. Eng. J.* 103 (2015) 227–233.
- [23] K. Rezaei, F. Temelli, E. Jenab, Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 272–280.
- [24] U. Salgin, S. Salgin, S. Takaç, The enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester in supercritical CO<sub>2</sub> using *Candida rugosa* lipase, *J. Supercrit. Fluids* 43 (2007) 310–316.
- [25] T. Matsuda, Recent progress in biocatalysis using supercritical carbon dioxide, *J. Biosci. Bioeng.* 115 (2013) 233–241.
- [26] A.J. Mesiano, E.J. Beckman, A.J. Russell, Supercritical biocatalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 623–633.
- [27] T. Matsuda, K. Watanabe, T. Harada, K. Nakamura, Enzymatic reactions in supercritical CO<sub>2</sub>: Carboxylation, asymmetric reduction and esterification, *Catal. Today.* 96 (2004) 103–111.
- [28] S. Kamat, G. Critchley, E.J. Beckman, A.J. Russell, Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: III. Does carbon dioxide covalently modify enzymes? *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 610–620.

- [29] Ž Knez, M. Habulin, Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review, *J. Supercrit. Fluids* 23 (2002) 29–42.
- [30] H.B. Wright, M.B. Moore, Reactions of aralkyl amines with carbon dioxide, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 3865–3866.
- [31] S. Kamat, J. Barrera, E.J. Beckman, A.J. Russell, Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: I. optimization of enzyme environment, *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992) 158–166.
- [32] D. de Oliveira, A.C. Feihmann, C. Dariva, A.G. Cunha, J.V. Bevilacqua, J. Destain, J.V. Oliveira, Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 39 (2006) 117–123.
- [33] P. Dos Santos, C.A. Rezende, J. Martinez, Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 107 (2016) 170–178.
- [34] Y. Ikushima, N. Saito, M. Arai, H.W. Blanch, Activation of a lipase triggered by interactions with supercritical carbon dioxide in the near-critical region, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 8941–8944.
- [35] S.V. Kamat, B. Iwaszkewycz, E.J. Beckman, A.J. Russell, Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids: tuning enzyme activity by changing pressure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 2940–2944.
- [36] S.V. Kamat, E.J. Beckman, A.J. Russell, Control of enzyme enantioselectivity with pressure changes in supercritical fluorofrom, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 8845–8846.
- [37] H. Nakaya, O. Miyawaki, K. Nakamura, Determination of log P for pressurized carbon dioxide and its characterization as a medium for enzyme reaction, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 176–182.
- [38] T. Moriyoshi, T. Kita, Y. Uosaki, Static relative permittivity of carbon dioxide and nitrous oxide up to 30 MPa, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 97 (1993) 589–596.
- [39] F. Bordes, S. Barbe, P. Escalier, L. Mourey, I. André, A. Marty, S. Tranier, Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase, *Biophys. J.* 99 (2010) 2225–2234.
- [40] Y. Ikushima, Supercritical fluids: an interesting medium for chemical and biochemical processes, *Adv. Colloid Interface Sci.* 71–72 (1997) 259–280.
- [41] A. Marty, J.S. Condoret, Enzymatic transformations in supercritical fluids, in: E.N. Vulfson, P.J. Halling, H.L. Holland (Eds.), *Enzym. Nonaqueous Solvents Methods Protoc., Methos in*, Springer Science & Business Media, 2001, pp. 587–602.
- [42] R. Wiebe, V.L. Gaddy, Vapor Phase Composition of carbon dioxide-water mixtures at various temperatures and at pressures to 700 atmospheres, *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 475–477.





### 3.3.3. Conclusion de la publication

L'étude de l'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique (par Lip2p V232S) en système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* a permis de dégager plusieurs spécificités pour ce genre de système :

- La solubilisation du CO<sub>2</sub> dans la phase aqueuse entraîne une forte diminution du pH pH proche 3 à 32 °C dès 25 bar (cf Figure 24, Chapitre I paragraphe 1.5.3.8.2). Or Lip2p de *Y. lipolytica* (et à fortiori Lip2p V232S) possède un pH optimal compris entre 6 et 8 et celle-ci n'est pas active à pH 3. On a alors envisagé de maintenir le pH à une valeur permettant l'activité de l'enzyme par ajout d'additifs. Cela peut être un tampon (des sels, ici du tampon phosphate qui est le tampon de culture de la levure) ou alors une base. L'ajout d'une base pour éviter la baisse du pH (du fait de la solubilisation du CO<sub>2</sub>) serait une très bonne solution mais un système d'ajout d'une quantité de base précise sous pression serait nécessaire et n'était pas envisageable avec l'appareillage utilisé (car si la base est placée dans le réacteur avant de mettre le CO<sub>2</sub> le pH basique pourrait désactiver l'enzyme). C'est pourquoi l'ajout de sels a été la solution privilégiée. Une étude de l'influence de la quantité de sel sur le pH induit a été effectuée à l'aide d'un indicateur coloré (le pourpre de bromocrésol) et d'un système de spectroscopie UV-Vis adapté à une cellule haute pression. L'ajout de sels a été une méthode fructueuse, la stabilité de l'enzyme a été largement accrue et a permis d'atteindre des taux de conversion satisfaisants (conversion >80 % en 96 h).
- Le système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* peut entraîner des questions d'efficacité de mélange et d'aire inter-faciale. Les expériences menées n'ont pas permis de dégager une réponse claire mais aucune des solutions technologiques proposées (augmentation de vitesse de rotation ou changement du mobile d'agitation) n'a entraîné une amélioration des rendements de la réaction. De plus ce phénomène de transfert de matière, même si on admet son influence, n'est pas le seul à mettre en cause car il ne pourrait pas à lui seul expliquer l'effet négatif très significatif de la pression que nous avons observé.
- Il est apparu que le phénomène à l'origine des différences de vitesses initiales entre le système *phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* était réversible. En effet,

une expérience a permis de le prouver (voir paragraphe 3.6 de la publication précédente).

- Dans un système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*, une quantité non négligeable d'eau est solubilisée dans le CO<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> est ainsi plus polaire que le CO<sub>2</sub> pur. Il est fait l'hypothèse que cette polarité accrue pouvait entraîner une mauvaise conformation du volet moléculaire (cf 1.2.1.5) de l'enzyme et donc une activité plus faible. Pour étayer cette théorie une expérimentation en parallèle avec une enzyme possédant un volet moléculaire et l'autre non (par exemple *C. antarctica*) pour une réaction simple et courte (pour éviter les phénomènes à long terme) serait intéressante à mettre en œuvre.
- D'autres explications plus classiques quant au fait que la vitesse diminue lorsque la pression augmente et non liées au système diphasique mais seulement à l'utilisation de CO<sub>2</sub> n'ont cependant pas été écartées. Il pourrait s'agir par exemple de l'augmentation de la densité du CO<sub>2</sub> pouvant conduire à l'augmentation des interactions CO<sub>2</sub> / enzyme. De plus, il a déjà été montré que la formation de carbamates pouvait être néfaste à l'activité de l'enzyme (Wright and Moore, 1948). La modélisation moléculaire de l'enzyme et particulièrement du site actif en présence de CO<sub>2</sub> serait très intéressante et pourrait montrer que certaines enzymes ne sont pas adaptées à une utilisation en CO<sub>2</sub> dans certains cas (dépendant du substrat bien sûr).

Le paragraphe suivant présente les résultats complémentaires obtenus lors de l'étude de la résolution de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique en milieu diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* mais qui n'ont pas été intégrés à la publication.

### **3.3.4. Annexes**

#### **3.3.4.1. Effet de la dialyse du surnageant de culture**

Il a été envisagé que l'utilisation directe du surnageant du milieu de culture de *Y. lipolytica* (contenant l'enzyme Lip2p V232S) pouvait entraîner des réactions entre le CO<sub>2</sub> et des éléments du milieu de culture imprévues et potentiellement néfastes pour l'activité de l'enzyme. Une purification complète de la protéine était difficilement envisageable du fait des grandes quantités d'enzymes nécessaires pour les expérimentations en CO<sub>2</sub>SC. C'est

pourquoi une dialyse a été employée pour retirer une grande partie des constituants du surnageant de culture avant son utilisation en réacteur. Après la dialyse, on constate une perte d'activité de l'enzyme d'environ 20 % (cf Tableau 9).

Tableau 9 : Effet de la dialyse du surnageant de culture sur l'activité pNPB du surnageant

Le test pNPB est effectué à pH7,2 et 25 °C, en microplaque. Les activités sont données en  $\mu\text{mol}$  de pNP libéré par mn et mL d'enzyme

Type de surnageant	Activité pNPB (U/mL)
232S	10,5
232S dialysé	8,4

La Figure 36 présente l'effet de la dialyse sur l'hydrolyse du substrat d'intérêt par Lip2p V232S en système diphasique *phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*. L'effet de la dialyse semble négligeable dans les deux types de système, c'est pourquoi cette étape de purification n'a pas été renouvelée par la suite.

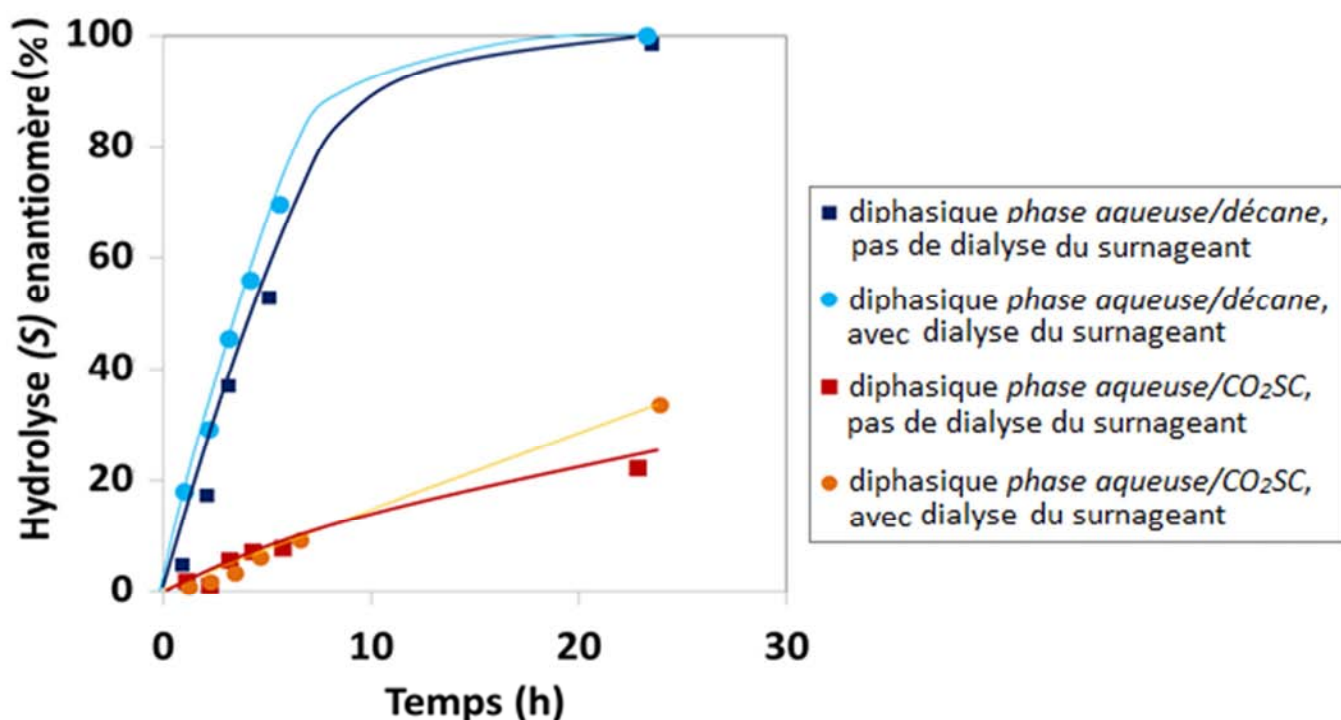


Figure 36 : Effet de la dialyse du surnageant de culture sur la réaction en système diphasique *phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*

Hydrolyse du (S) ester de l'acide octylique du 2 bromo phényl acétique par Lip2p V232S (l'énantiomère (R) n'étant pas hydrolysé par l'enzyme, 50 mM de (R, S) ester au départ), 33 °C, 0 ou 120 bar (décane ou CO<sub>2</sub>SC), 1 mol/L sels (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7), agitateur magnétique vitesse 1600 tr/mn, réacteur de 90 mL, les volumes de chaque phase sont égaux

#### 3.3.4.2. Formation de carbonates

Pour pallier la baisse du pH de la phase aqueuse de fortes quantités de sels (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ont été ajoutées dans le milieu. Il a été envisagé que ces sels en présence de CO<sub>2</sub>

pouvaient former des carbonates pouvant précipiter et perturber le système (carbonates de potassium ou carbonates de sodium). Pour évaluer la possibilité d'occurrence de ce phénomène, une expérience de mise en contact d'une phase aqueuse contenant ces sels avec du CO<sub>2</sub> pendant 4 h dans les mêmes conditions que celles de la réaction (120 bar, 33 °C) a été réalisée dans la cellule haute pression. La précipitation de carbonates n'a pas été détectée visuellement.

### 3.3.4.3. Utilisation de tensio-actifs

En plus des expériences de changement de mobile d'agitation ou de changement de vitesse d'agitation (cf paragraphe 3.3.2) il a été envisagé d'utiliser des composés tensio-actifs pour augmenter l'aire interfaciale qui est un paramètre important (Saktaweewong et al., 2011).

En effet, nous avons supposé que l'aire interfaciale pouvait être différente dans les deux systèmes ce qui aurait pu expliquer les vitesses de conversion plus faibles pour le cas du système *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*.

Deux tensio-actifs ont été testés : le polypropylène glycol et le poly(diméthylsiloxane)-poly(éthylène oxyde).

Dans un premier temps ces deux tensio-actifs ont été testés en tube Eppendorf (2 mL) en milieu diphasique *phase aqueuse/décane* avec deux concentrations : 1 % et 10 % (1 % ou 10 % du volume total des deux phases à savoir, 1,5 mL). La Figure 37 présente les résultats de ces expériences.

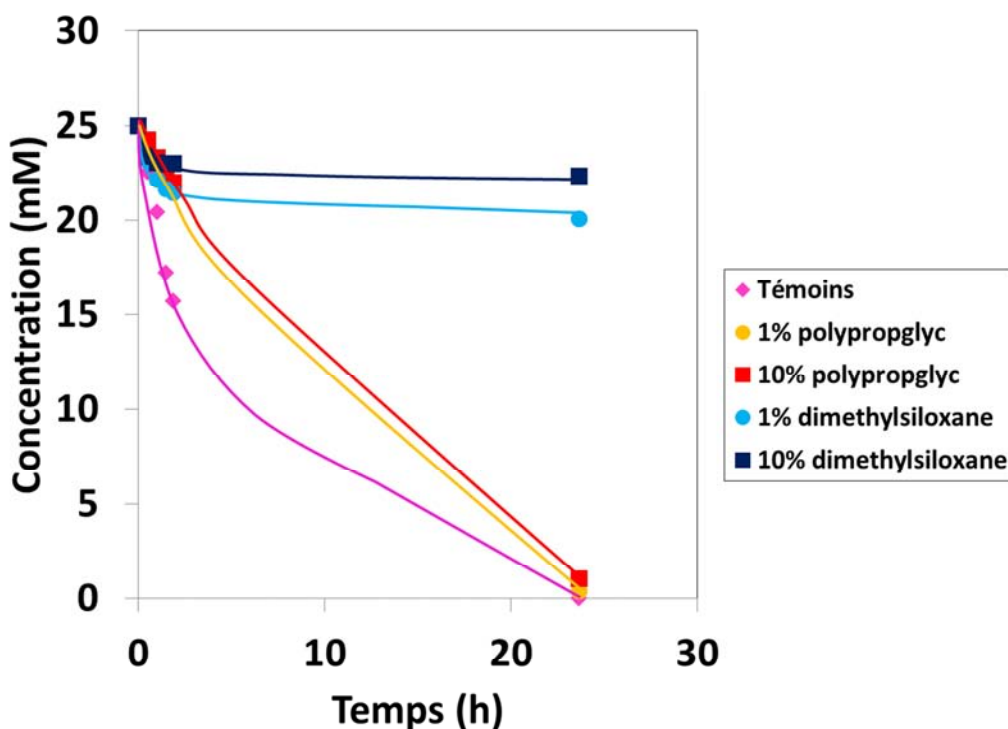


Figure 37 : Effet des surfactants sur l'hydrolyse du (S) ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique en diphasique phase aqueuse/décane par Lip2p V232S

Réaction effectuée dans un tube Eppendorf de 2 mL, 750  $\mu$ L de chaque phase, 50 mM de (R, S) ester dans la phase organique, agitateur de type vortex, température ambiante. Les surfactants testés sont le polypropylène glycol et le poly(diméthylsiloxane)-poly(éthylène oxyde)

Quelles que soient la nature et la quantité de tensio-actifs aucun effet positif n'a été constaté dans les conditions testées. En revanche, dans un tel système agité par un agitateur de type vortex l'aire interfaciale est peut-être déjà maximale sans tensio-actif, ce qui peut expliquer que seul l'effet négatif est visible. Il a été observé que le diméthylsiloxane avait un effet très négatif sur la réaction aux deux concentrations testées, ces deux concentrations étant peut-être trop élevées ou le composé lui-même n'est pas « accepté » par l'enzyme. A l'opposé les deux concentrations testées en polypropylène glycol ont un effet négatif sur les vitesses initiales de conversion de l'énantiomère hydrolysé mais la réaction est totale au bout de 24 h.

Fort de ces résultats, le polypropylène glycol à une concentration de 1 % (en volume total) a été testé en système diphasique phase aqueuse/ $CO_2SC$ . Cependant, cet ajout de tensio-actif n'a pas eu d'effet positif sur la cinétique de réaction. Ce résultat peut s'expliquer par la trop faible quantité de tensio-actif utilisée, sa nature, ou alors par le fait que l'aire interfaciale n'est pas le phénomène limitant de ce système diphasique phase aqueuse/ $CO_2SC$ . Cette explication est corroborée par le fait qu'aucune des tentatives pour améliorer l'aire

interfaciale n'a eu un effet positif sur les vitesses de réaction (ajout de tensio-actifs, changement du mobile ou de la vitesse d'agitation).

En ce qui concerne la vitesse d'agitation, comme précisé dans la publication, 1600 rpm est le maximum que peut offrir l'appareil expérimental. De plus, un mobile d'agitation à dispersion gazeuse, spécifiquement conçu pour cet appareil a été utilisé. Cependant les résultats n'ont montré aucune amélioration de la cinétique de réaction. De plus l'effet constaté de la pression sur la réaction tend à montrer que l'aire interfaciale n'est pas ou pas seulement l'explication de la différence de performances entre les deux systèmes.

L'utilisation de tensio-actifs (le di-sulfosuccinate fluoré, di-HCF<sub>4</sub>) pour obtenir une microémulsion *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* avait pourtant montré de bons résultats en conduisant à des cinétiques comparables avec ceux du système diphasique *phase aqueuse/heptane* (Holmes et al., 1998). Cependant la lipase était différente de celle qui nous utilisons (elle provenait de *Chromobacterium viscosum*), le tensio-actif également, et les temps de réaction testés étaient très courts (10mn). De plus aucune expérimentation sans tensio-actifs n'est présentée. Ainsi il est difficile d'émettre une opinion à ce stade sur l'intérêt d'utiliser des tensio-actifs.

En conclusion, l'hydrolyse diphasique (*phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*) de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique (avec Lip2p V232S de *Y. lipolytica* comme catalyseur énantiosélectif) est efficace en terme de taux de conversion mais des questions subsistent pour expliquer les différences de cinétiques observées en comparaison avec le système *phase aqueuse/décane*. La première étape clef pour permettre l'obtention de taux de conversions intéressants était de stabiliser le pH de la phase aqueuse (la baisse de pH étant due à la formation d'acide carbonique dans la phase aqueuse lorsqu'elle est en contact avec du CO<sub>2</sub>). La solution proposée était d'utiliser de fortes concentrations en tampon phosphate. Même après cette stabilisation effectuée des différences de cinétique subsistent (un facteur 10) et l'explication proposée est la formation de carbamates ou un effet négatif de la polarité du CO<sub>2</sub>SC dans un système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* du fait de la solubilité de l'eau dans le CO<sub>2</sub>SC (1,4 g/L à 32 °C, 100 bar (Marty and Condoret, 2001; Wiebe and Gaddy, 1941), cf Chapitre I paragraphe 1.5.3.2).

Le prochain paragraphe propose l'utilisation d'une autre lipase, la lipase de *C. rugosa* pour évaluer si les résultats obtenus sont propres à la lipase de *Y. lipolytica* ou peuvent être généralisés à d'autres lipases.

### **3.4. Hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique par la lipase de *Candida rugosa***

La lipase de *C. rugosa* (CRL) a également été étudiée pour la résolution de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique en diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* en comparaison avec le système diphasique *phase aqueuse/décane* comme précédemment avec la lipase de *Y. lipolytica*. Ce système avait déjà été validé en tube Eppendorf dans la littérature en utilisant les isoenzymes sécrétées par *Y. lipolytica* (CRL1, CRL3 et CRL4 de *C. rugosa*, utilisant comme système d'expression *Y. lipolytica*) (Piamtongkam et al., 2011). CRL1 possède une énantiosélectivité supérieure à 200, avec une énantiopréférence (*S*) comme Lip2p de *Y. lipolytica*. Ici nous avons utilisé le mélange commercial provenant de Fluka (3,85 U/mL) à 28 g/L qui sera utilisé, pour des raisons de gain de temps, pour éviter la culture de la levure pour la sécrétion de l'isoenzyme (cf 1.2.2). De plus pour obtenir des cinétiques de réactions comparables à celles de Lip2p V232S de *Y. lipolytica* à partir du surnageant de culture il faudrait le concentrer (30 fois pour CRL1 par exemple d'après nos expériences). Bien que ce soit un mélange de lipases provenant de *C. rugosa* le discours sera simplifié en la nommant « lipase ».

#### **3.4.1. Influence de la pression en présence de la lipase de *Candida rugosa***

Les expérimentations d'influence de pression ont été effectuées, dans les mêmes conditions de concentrations et température que les expériences du paragraphe 3.3.2., la conversion obtenue à 24 h est de 15 % à 200 bar contre 50 % à 120 bar. Ainsi de la même manière que pour Lip2p de *Y. lipolytica* la pression a un effet négatif sur la cinétique de conversion. Compte-tenu du fonctionnement de cette lipase, très similaire à Lip2p de *Y. lipolytica* avec en particulier la présence d'un volet moléculaire, les hypothèses sur les raisons de l'effet négatif de la pression sont les mêmes que dans le cas de Lip2p de *Y. lipolytica*.



### 3.4.2. Lipase de *Candida rugosa* vs lipase de *Yarrowia lipolytica*

Les activités pNPB des deux lipases sont présentées dans le Tableau 10 la concentration utilisée est de 28 g/L pour CRL et la concentration de Lip2p V232S est la concentration obtenue dans le surnageant de culture de *Y. lipolytica*. On observe la forte activité pNPB de la lipase commerciale CRL à cette concentration, plus de 10 fois supérieure à celle de Lip2p V232S de *Y. lipolytica*. Cette concentration importante (28 g/L) en CRL a été choisie pour obtenir des cinétiques proches de celles de Lip2p pour la réaction d'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique.

La lipase de *C. rugosa* est comparée à Lip2p V232S de *Y. lipolytica* pour l'hydrolyse en système diphasique (*phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*) du substrat d'intérêt et les résultats sont présentés dans la Figure 38. En système diphasique *phase aqueuse/décane*, la lipase de *Y. lipolytica* s'est révélée plus performante, alors que c'est la lipase de *C. rugosa* la plus performante en système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*. Rappelons tout de même que les concentrations en CRL sont très importantes par rapport à celle de Lip2p, les performances sont donc comparées dans des conditions bien spécifiques. Trois théories sont envisagées à ce stade. La première concerne le mécanisme d'ouverture du volet moléculaire de *C. rugosa* qui est peut-être moins impacté par une plus forte polarité du solvant CO<sub>2</sub>SC. La seconde théorie pourrait être que les carbamates formés par l'interaction entre le CO<sub>2</sub> et les acides aminés lysines de l'enzyme peuvent être moins nombreux ou placés de façon moins « dérangement » pour le positionnement du substrat dans le site actif dans le cas de CRL. La troisième hypothèse concerne la composition de la phase aqueuse, dans un cas il s'agit d'un surnageant de culture et dans l'autre d'un mélange commercial.

Tableau 10 : Activité pNPB de Lip2p de *Y. lipolytica* et de la lipase de *C. rugosa*  
Le test pNPB est effectué à pH7,2 et 25 °C, en microplaque. Les activités sont données en µmol de pNP libéré par mn et mL d'enzyme

Enzyme	Activité pNPB
Lip 2p V232S	10
CRL 28 g/L	129

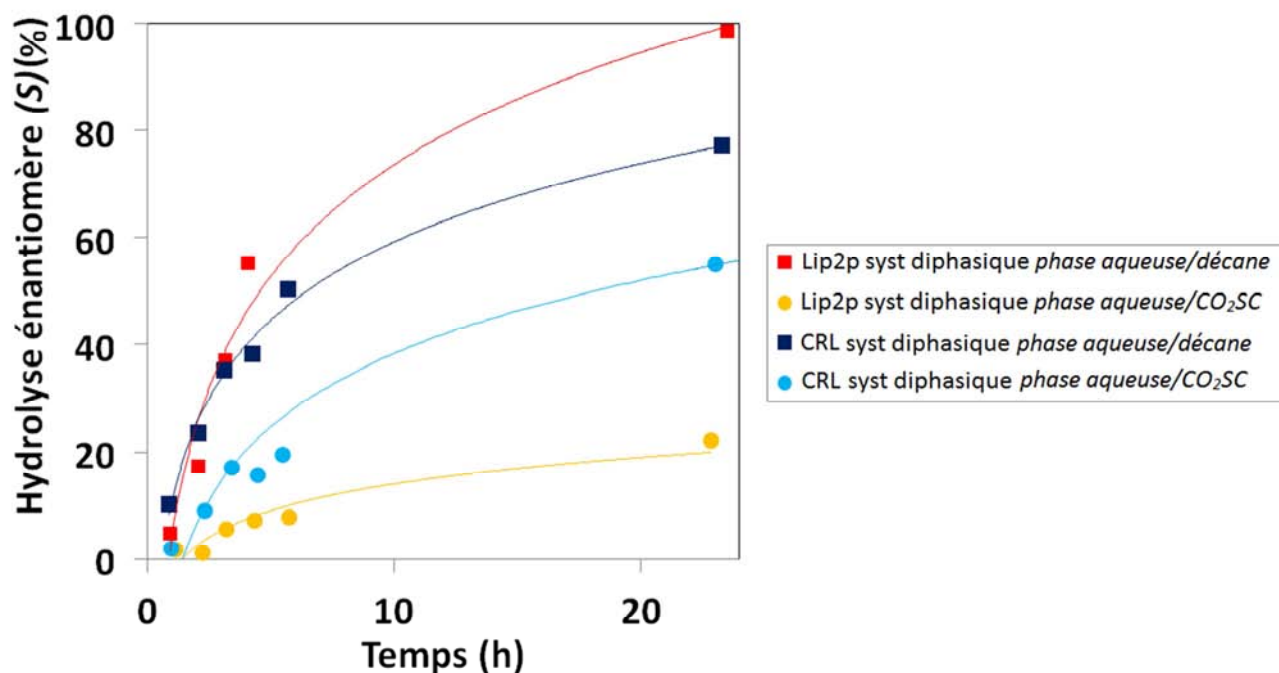


Figure 38 : Comparaison des performances de la lipase provenant de *C. rugosa* (CRL) et Lip2p V232S provenant de *Y. lipolytica* pour l'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique en système diphasique Système diphasique *phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*, 33 °C 1 mol/L de sel ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7), 0 ou 120 bar (décane ou  $\text{CO}_2\text{SC}$ ), agitateur magnétique 1600 tr/mn, dans le réacteur de 90 mL, volumes des phases sont égaux

La réaction avec la lipase de *C. rugosa* a été suivie sur des temps longs (100 h) et la conversion était alors de 90 % en système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* ce qui montre que de la même façon que pour la lipase de *Y. lipolytica* les cinétiques de réactions sont moins rapides en système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* qu'en système *phase aqueuse/décane* mais de fortes conversions sont néanmoins obtenues.

### 3.4.3. Effet de la polarité

La même expérience que celle qui a été décrite dans le paragraphe 3.3.2 a été effectuée pour mettre en évidence sur l'activité la lipase de *C. rugosa* (Fluka 2,8 g/L) l'effet de l'augmentation de la polarité de la phase organique en utilisant du 5-méthyl-2-hexanone (5M2H) au décane. Les résultats sont présentés sur la Figure 39.

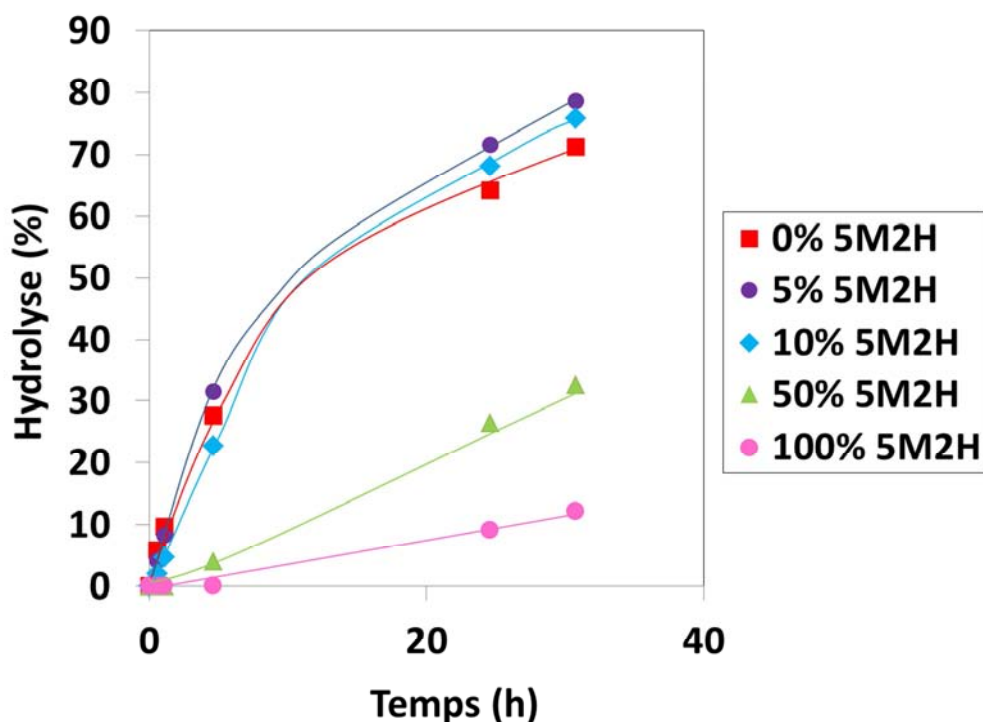


Figure 39 : Effet de l'augmentation de la polarité de la phase organique sur l'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique par la lipase de *C. rugosa* en système diphasique *phase aqueuse/décane*. Le décane est mélangé avec différentes quantités de 5M2H (% en volume), seul l'énantiomère (*S*) est hydrolysé, 50 mM de (*R, S*) ester au départ, les volumes de phases sont égaux (750  $\mu$ L), en tube Eppendorf (2 mL avec une agitation sur agitateur de type vortex, à température ambiante)

Contrairement à ce qui s'est produit pour Lip2p de *Y. lipolytica* il faut plus de 10 % de 5M2H pour réduire significativement la vitesse initiale de la réaction. De plus, alors qu'à 50 % de 5M2H la vitesse de réaction avec Lip2p est quasiment nulle, ce n'est pas le cas pour la lipase de *C. rugosa*, qui est toujours active lorsque la phase organique est composée uniquement de 5M2H (100 % de 5M2H). Ainsi il semble que la polarité ait moins d'effet sur la lipase de *C. rugosa* (si bien entendu c'est l'effet de la polarité qui prime car il est aussi possible d'envisager un effet direct de la molécule de 5M2H sur l'enzyme). Si la polarité a bien un effet sur l'ouverture du volet moléculaire alors il est possible de conclure que la polarité a moins d'effet sur l'ouverture du volet moléculaire dans le cas de cette lipase comparé à Lip2p. Cela corroborerait avec le fait que la lipase de *C. rugosa* montre de meilleurs résultats en CO<sub>2</sub>SC (avec les concentrations en enzyme testées). Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour valider cette théorie avec l'utilisation d'une lipase sans volet moléculaire comme par exemple une lipase issue de *C. antarctica* ou alors de la modélisation moléculaire pour modéliser l'ouverture du volet moléculaire dans des solvants plus ou moins polaires ou encore la formation de carbamates. Cependant, il est difficile de

penser que l'effet négatif de la pression est dû à une augmentation de polarité du solvant car pour la lipase de *C. rugosa* la polarité devrait avoir beaucoup moins d'effet et l'augmentation de la polarité avec l'augmentation de la pression est mineure...

### 3.5. Conclusion Chapitre III

La première partie de ce chapitre a présenté la mise au point de l'immobilisation de Lip2p de *Y. lipolytica* dans l'objectif d'utiliser l'enzyme immobilisée en système monophasique décane. Bien que plusieurs supports permettant l'immobilisation de l'enzyme aient été testés, (Accurel MP1000, Purolite ECR 1604 ou Purolite ECR 8214 notamment) la mise en œuvre de l'enzyme immobilisée en système monophasique décane pour l'estérification de l'acide 2-bromo phényl acétique n'a pas permis d'obtenir des taux de conversions intéressants (<5 % en 70 h). L'hypothèse avancée pour expliquer ces faibles taux de conversion est que l'équilibre thermodynamique est atteint dans ces conditions.

L'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl avait déjà été mise au point lors de la recherche d'enzymes énantiosélectives. L'eau étant un substrat de la réaction d'hydrolyse seuls les systèmes diphasique *phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* ont été envisagés et non le système monophasique décane car l'eau n'est pas soluble dans ce solvant organique.

L'utilisation d'un système diphasique pour effectuer une biocatalyse, notamment avec du CO<sub>2</sub>SC est peu étudié dans la littérature. Cette configuration évite l'étape l'immobilisation de l'enzyme car celle-ci sera solubilisée dans la phase aqueuse. Une différence importante entre ces deux systèmes (CO<sub>2</sub> et décane) est liée à la diminution du pH de la phase aqueuse en contact avec du CO<sub>2</sub> sous pression, du fait de la solubilisation du CO<sub>2</sub> dans cette phase. Comme attendu l'utilisation de tampon qui a permis un maintien du pH de la phase aqueuse à 6 et donc des taux de conversions importants en système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*. D'importants taux de conversion (>90 %) et un fort excès énantiomérique ont été obtenus en système diphasique *phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*. L'influence de l'ajout d'une grande quantité de sel pourrait avoir une influence sur l'a<sub>w</sub> ou encore la viscosité pouvant expliquer l'effet négatif observé sur les cinétiques en système *phase aqueuse/décane*. Cependant les cinétiques observées en système *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* se sont révélées significativement plus faibles que celles observées avec du

décane. Une meilleure agitation n'a pas permis d'améliorer les cinétiques indiquant que le transfert de matière ou l'aire interfaciale ne sont probablement pas les causes. L'hypothèse proposée est relative à l'ouverture du volet moléculaire du site actif de la lipase qui pourrait être négativement impactée par une hydrophobicité moins importante du CO<sub>2</sub> par rapport au décane. En effet une quantité d'eau est solubilisée dans la phase CO<sub>2</sub>SC diminuant de ce fait son hydrophobicité. Cette hypothèse est supportée par l'effet négatif de la pression observé sur la cinétique de la réaction. En effet l'équilibre thermodynamique eau-CO<sub>2</sub> nous indique que lorsque la pression augmente, l'hydratation du CO<sub>2</sub> augmente et donc son hydrophobicité diminue. Des travaux complémentaires seraient nécessaires pour comprendre les spécificités du remplacement de la phase organique par le CO<sub>2</sub>. Les tendances observées en milieu diphasique pour la résolution de l'acide 2-bromo phényl acétique avec Lip2p de *Y. lipolytica* ont été confirmées avec la lipase de *C. rugosa*.

La résolution énantiomérique de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique a été effectuée en système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* avec Lip2p de *Y. lipolytica* et la lipase de *C. rugosa*, la conversion de plus de 90 % a pu être obtenue en 100 h.

Le prochain chapitre propose d'étudier la résolution de l'ibuprofène via une réaction d'estérification dans les deux systèmes, monophasique (décane ou CO<sub>2</sub>SC) et diphasique (*phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*).

# Chapitre IV : Résolution de l'ibuprofène



## Chapitre IV : Résolution de l'ibuprofène

### 4.1. Introduction Chapitre IV

Ce chapitre est dédié à l'étude de la résolution de l'ibuprofène racémique grâce à une réaction d'estérification (Figure 40). L'étude de ce substrat par rapport au substrat présenté dans le chapitre précédent (l'acide 2-bromo-phényl-acétique) est intéressante car l'équilibre thermodynamique est différent, la réaction d'estérification permet des taux de conversion élevés (>80 %) avec les concentrations choisies contrairement à ce qui s'est produit avec l'acide 2-bromo-phényl-acétique dans le Chapitre III. Dans le cas d'une estérification, les deux types de systèmes seront étudiés (diphasique *phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*, ou monophasique décane ou CO<sub>2</sub>SC comme seul solvant). L'eau est un produit de la réaction d'estérification, la présence d'eau peut donc paraître a priori désavantageuse car son activité est élevée dans les deux phases (voisine de 1) mais il apparaîtra que le système diphasique est néanmoins intéressant même pour une réaction d'estérification. L'enzyme sera utilisée sous forme libre (dissoute dans l'eau dans le système diphasique) ou immobilisée (système monophasique). Les différents systèmes et solvants étudiés sont résumés dans le Tableau 11. Les deux alcools, l'éthanol et l'octane-1-ol seront étudiés comme réactifs. L'enzyme utilisée pour cette réaction est l'enzyme possédant une énantiosélectivité infinie envers l'ibuprofène et qui a été décrite dans le Chapitre II, c'est-à-dire Lip2p V232A de *Yarrowia lipolytica*.



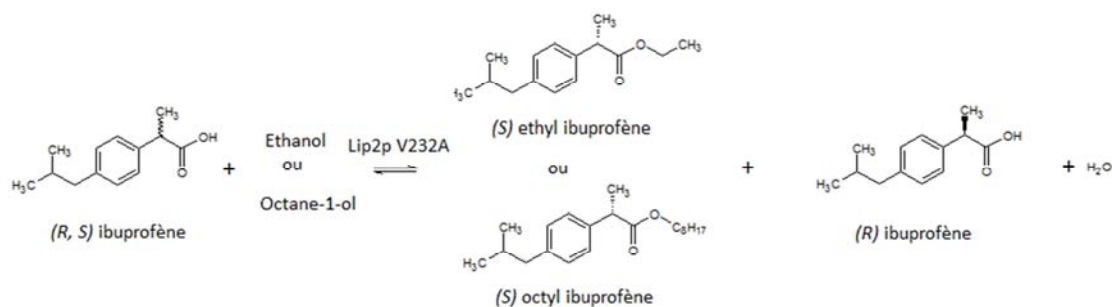

 Figure 40 : Réaction, estérification énantiosélective de l'ibuprofène par Lip2p V232A de *Y. lipolytica*

 Tableau 11 : Expérimentations réalisées dans ce chapitre  
 Résolution de l'ibuprofène par Lip2p V232A de *Y. lipolytica*

Solvant apolaire	Décane				CO <sub>2</sub> SC	
	Tube Eppendorf (2 mL)		Réacteur (90 mL)		Réacteur (90 mL)	
Nombre phases (solvant)	Monophasique	Diphasique	Monophasique	Diphasique	Monophasique	Diphasique
Estérification	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	4.2.1.1 et 4.2.1.2	4.3.1	4.2.1.3	4.3.2	4.2.2	4.3.2

## 4.2. Estérification de l'ibuprofène en système monophasique (décane et CO<sub>2</sub>SC)

### 4.2.1. Estérification de l'ibuprofène en système monophasique décane

#### 4.2.1.1. Estérification éthylique de l'ibuprofène en système monophasique décane

Une série d'expérimentations a été menée pour étudier l'estérification éthylique de l'ibuprofène en système monophasique décane où l'enzyme est utilisée sous sa forme immobilisée (le choix des supports est expliqué dans Chapitre III paragraphe 3.2.1). Les conditions expérimentales testées sont répertoriées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Conditions expérimentales de l'estérification éthylique de l'ibuprofène en système monophasique décane Tube Eppendorf (2 mL) à température ambiante, agitateur de type vortex

<b>Supports d'immobilisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Purolite ECR 1604</li> <li>• Purolite ECR 8214</li> <li>• Accurel MP1000</li> </ul>
<b>Quantité d'enzyme</b>	0,38 U / mg d'ibuprofène (cf Chapitre III, paragraphe 3.2.1.2, équation 2)
<b>Solvant</b>	Décane, 750 $\mu$ L
<b>Concentration en ibuprofène</b>	47 mM
<b>Concentration en éthanol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM</li> <li>• 200 mM</li> <li>• 1000 mM</li> </ul>

Seulement des traces d'estérification éthylique ont été détectées en 24 h, quelles que soient les conditions. A ce stade des expérimentations supplémentaires auraient dû être menées pour déterminer si la limitation est thermodynamique ou cinétique. La présence d'éthanol miscible avec le décane peut en effet jouer un rôle sur la polarité du solvant (qui sera accrue) et donc sur l'équilibre thermodynamique mais également sur la stabilité ou l'activité de l'enzyme (l'ouverture du volet moléculaire par exemple).

A ce stade l'utilisation d'un alcool moins polaire semble intéressante et c'est pourquoi l'octane-1-ol a finalement été choisi comme modèle.

#### 4.2.1.2. Estérification octylique de l'ibuprofène en système monophasique décane

L'estérification énantiosélective octylique de l'ibuprofène a été étudiée avec l'enzyme immobilisée sur les trois supports permettant l'immobilisation la plus efficace (cf Chapitre III paragraphe 3.2.1). Les conditions de réaction étudiées sont décrites dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Conditions expérimentales de l'estérification octylique de l'ibuprofène en système monophasique décane Tube Eppendorf (2 mL) à température ambiante, agitateur de type vortex

<b>Supports d'immobilisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Purolite ECR 1604</li> <li>• Purolite ECR 8214</li> <li>• Accurel MP1000</li> </ul>
<b>Quantité d'enzyme</b>	0,38 U / mg d'ibuprofène (cf Chapitre III, paragraphe 3.2.1.2, équation 2)
<b>Solvant</b>	Décane, 750 $\mu$ L
<b>Concentration en ibuprofène</b>	47 mM
<b>Concentration en octane-1-ol</b>	200 mM

La Figure 41 montre l'évolution de la concentration de (S) octyl ibuprofène dans le milieu réactionnel en fonction du temps avec Lip2p V232A immobilisée sur les trois supports

différents. Les résultats ont révélé que l'activité de Lip2p V232A (pour l'estérification du (*S*) ibuprofène) immobilisée sur le support Purolite ECR 8214 (en rouge sur la Figure 41) est beaucoup plus élevée que pour un autre support, montrant non seulement des vitesses initiales plus élevées (pentes des parties linéaires des courbes dans la Figure 41), mais aussi des conversions plus élevées, après 24 h de réaction. Cependant en utilisant des quantités d'enzymes plus importantes quel que soit le support une conversion maximale d'environ 100 % peut être obtenue.

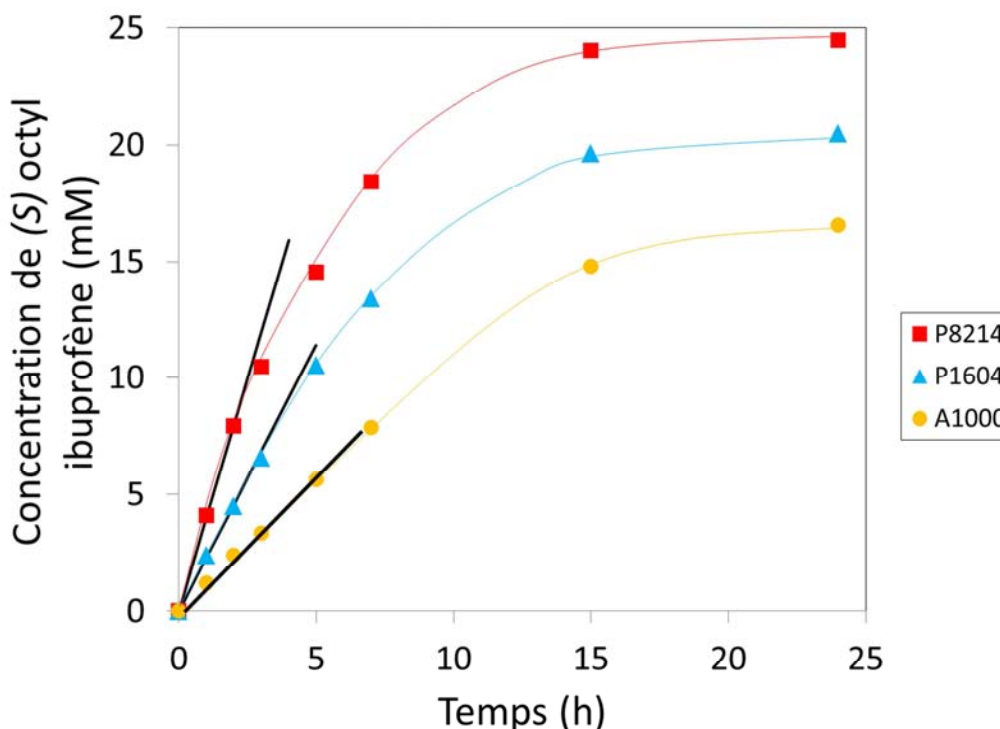


Figure 41 : Estérification octylique du (*S*) ibuprofène en utilisant Lip2p V232A immobilisée en système monophasique décane

Trois supports différents sont testés : Purolite ECR8214, Purolite ECR 1604 et Accurel MP1000. Les lignes continues représentent les vitesses initiales. Les expérimentations sont réalisées à température ambiante, avec 47 mM (*R*, *S*) ibuprofène, 200 mM d'octane-1-ol dans 750  $\mu$ L de décane dans un tube Eppendorf de 2 mL, agitateur de type vortex, activité enzymatique correspondant à 0,38 U / mg d'ibuprofène

Le Tableau 14 présente les valeurs des vitesses initiales ( $v_i$ ) et de la conversion, obtenues pour les trois supports testés. Des traces de (*R*) octyl ibuprofène ont été détectées (toujours <1 mM, mais  $v_i$  (*R*) non nul), ces résultats auraient dû être confirmés du fait des conditions d'analyse de l'octyl ibuprofène qui peut entraîner des biais (solvant HPLC 100 % d'hexane ce qui entraîne l'encrassement de la colonne chirale et l'utilisation d'échantillons non dilués qui entraîne un chromatogramme avec de nombreux petits pics). Dans tous les cas l'énantiosélectivité reste élevée.

Le Tableau 14 confirme que l'enzyme immobilisée sur Purolite 8214 présente la vitesse initiale la plus élevée (0,066 mM/min) et le meilleur taux de conversion à 15 h de réaction (23 mM sur 23,5 mM totaux théorique donc 97,9 %).

**Tableau 14 : Comparaison de l'estérification octylique énantiosélective de l'ibuprofène par le mutant Lip2p V232A immobilisé**

Les expérimentations sont réalisées à température ambiante, avec 47 mM de (*R*, *S*) ibuprofène, 200 mM d'octane-1-ol dans 750 µL de décane dans un tube Eppendorf de 2 mL, agitateur de type vortex, activité enzymatique correspondant à 0,38 U / mg d'ibuprofène

Support <sup>a</sup>	$v_i(S)^b$ (mmol/L.min)	$v_i(R)^b$ (mmol/L.min)	Conversion (%)	E $(v_i(R)/v_i(S))^b$
P-8214	0,066	$3.10^{-4}$	98 (t=15 h)	217
P-1604	0,038	$2.10^{-4}$	82 (t=15 h)	180
A-1000	0,019	$1.10^{-4}$	66 (t=24 h)	161

<sup>a</sup> P : Purolite ECR, A : Accurel MP.

<sup>b</sup>  $v_i$  : vitesses initiales de l'estérification de l'énantiomère (*S*) ou (*R*).

Compte-tenu de ces résultats préliminaires, les supports de type Purolite (ECR 1604 ou ECR 8214) ont été retenus et une étude cinétique plus poussée de la réaction d'estérification du (*S*) ibuprofène pour obtenir le (*S*) octyl ibuprofène en présence du mutant Lip2p V232A immobilisé sur ces supports a été réalisée.

Plusieurs modèles pour décrire la cinétique des lipases ont été proposés dans la littérature : Michaelis-Menten (Cui et al., 2013) ou Ping-Pong Bi-Bi avec inhibition ou non (Blattner et al., 2006; Chulalaksananukul et al., 1993; Ciftci and Temelli, 2013; Dossat et al., 2002; Liu and Huang, 2010; Palocci et al., 2008; Zhang and Liu, 2011). Pour pouvoir déterminer le meilleur choix de modèle plusieurs expériences ont été menées avec notamment différentes concentrations initiales d'ibuprofène et d'octane-1-ol afin de déterminer l'effet de la concentration des substrats sur les vitesses initiales de conversion. Toutes les expériences ont été réalisées en tube Eppendorf de 2 mL, à température ambiante, en utilisant 2,5 mg de support portant Lip2p V232A (équilibré à  $a_w = 0,5$ , cf paragraphe 3.2.1.2, Figure 32) et 750 µL de décane en tant que solvant réactionnel sur un agitateur de type vortex.

Les valeurs expérimentales des vitesses initiales ( $v_i$ ) sont présentées dans le Tableau 15 et Tableau 16. D'après le Tableau 15 on observe l'existence d'une vitesse initiale maximale (grisée dans le tableau) correspondant à une concentration intermédiaire en octane-1-ol

(parmi les concentrations testées), laissant supposer un effet inhibiteur de ce composé sur la réaction.

**Tableau 15 : Vitesses initiales ( $v_i$ ) en fonction de la concentration initiale en octane-1-ol**  
En utilisant 47 mM de (*R, S*) ibuprofène racémique, et 2,5 mg de support portant Lip2p V232A, en tube Eppendorf (2 mL) avec 750  $\mu$ L de décane à température ambiante, agitateur de type vortex

Concentration des substrats (mmol/L)		$v_i$ (S) (mmol/L.min)	
(S) Ibuprofène	Octane-1-ol	Purolite ECR8214	Purolite ECR1604
24	25	0,055	0,029
24	34	0,058	0,031
24	42	0,063	0,033
24	50	0,066	0,035
24	101	0,065	0,041
24	151	0,064	0,038
24	202	0,059	0,034
24	303	0,055	0,028
24	353	0,053	0,027

**Tableau 16 : Vitesses initiales ( $v_i$ ) en fonction de la concentration initiale en (S) ibuprofène**  
2,5 mg de support portant Lip2p V232A, en tube Eppendorf (2 mL) avec 750  $\mu$ L de décane à température ambiante, agitateur de type vortex (c'est le (*R, S*) ibuprofène qui est utilisé mais le (*R*) ibuprofène n'étant pas hydrolysé seul le (*S*) ibuprofène est considéré dans les résultats)

(S) ibuprofène (mmol/L)	Purolite 8214 $v_i$ (S) (mmol/L.min)		Purolite 1604 $v_i$ (S) (mmol/L.min)	
	[Oct] <sup>a</sup> = 50	[Oct] <sup>a</sup> = 200	[Oct] <sup>a</sup> = 100	[Oct] <sup>a</sup> = 200
5	0,022	0,018	4,8	0,018
12	0,048	0,036	11	0,036
18	0,058	0,047	18	0,047
25	0,067	0,057	25	0,057
29	0,072	0,059	28	0,059
35	0,077	0,062	33	0,062

<sup>a</sup> [Oct]: Concentration initiale octane-1-ol (mmol/L)

D'après le Tableau 16 en revanche l'ibuprofène ne semble pas avoir d'effets inhibiteur dans la gamme de concentrations testées quel que soit le support car la vitesse initiale maximale est obtenue avec la concentration la plus élevée en ibuprofène.

Les observations précédentes nous a conduit à sélectionner le modèle ping-pong Bi Bi, très utilisé dans la littérature, avec l'alcool (octane-1-ol) comme inhibiteur compétitif, pour décrire le comportement cinétique de cette réaction. La vitesse initiale peut être exprimée à partir de l'équation suivante (Équation 3) :

## Équation 3 : Equation du modèle Ping-pong Bi Bi

$$V_i = \frac{V_{max}[ibu][OH]}{K_{Mibu}[OH] + \frac{K_{Mibu}[OH]^2}{K_i} + K_{MOH}[ibu] + [ibu][OH]}$$

où :

[ibu] : concentration (S) ibuprofène, en mmol/L

[OH] : concentration en octane-1-ol, en mmol/L

$K_{Mibu}$ ,  $K_{MOH}$  : constantes d'affinité pour l'ibuprofène et l'octane-1-ol respectivement (mM).

$K_i$  : constante d'inhibition (mM)

$V_{max}$  : vitesse maximale (mmol/L.min)

L'ensemble des données expérimentales des vitesses initiales ( $v_i$  (S)) a ensuite été utilisé pour ajuster les paramètres du modèle ping-pong Bi-Bi ( $V_{max}$ ,  $K_i$ ,  $K_{MA}$  et  $K_{MB}$ ). Pour chaque support, l'ajustement a été réalisé en utilisant le Solveur Excel™, en minimisant la fonction objectif présentée dans l'Équation 4 :

## Équation 4 : Fonction objectif du solveur Excel

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^{Np} \left( \frac{v_i^{exp} - v_i^{modèle}}{v_i^{exp}} \right)^2$$

Les Figure 42 et Figure 43 montrent les valeurs des vitesses initiales expérimentales et ajustées avec le modèle Ping-Pong Bi-Bi, en fonction de la concentration initiale en ibuprofène et octane-1-ol. Les résultats présentés sur ces figures montrent que le modèle cinétique choisi conduit à priori à une bonne représentation du comportement expérimental.

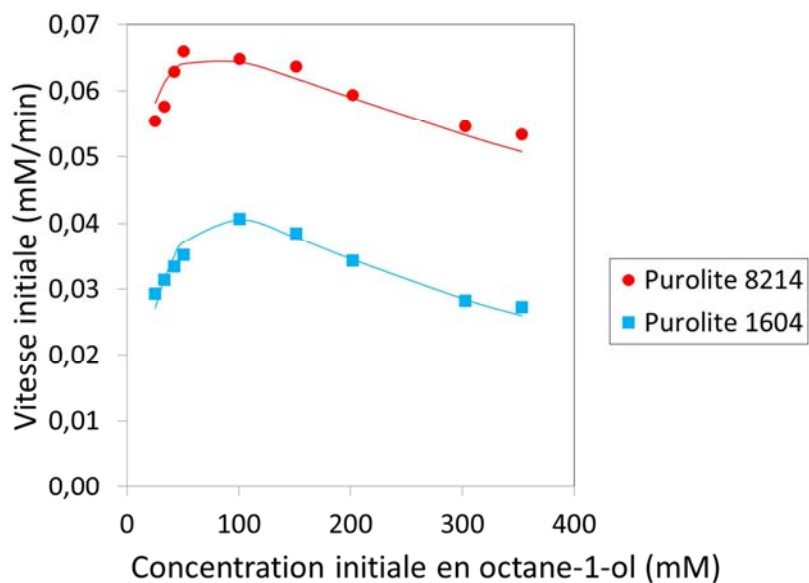


Figure 42 : Effet de la concentration initiale en octane-1-ol sur la vitesse initiale d'estérification du (*S*) ibuprofène  
 La concentration initiale en (*R*, *S*) ibuprofène est de 47 mM, les expérimentations sont réalisées à température ambiante, en utilisant Lip2p V232A immobilisée sur Purolite 8214 et Purolite 1604, dans 750  $\mu$ L de décane en tube Eppendorf avec un agitateur de type vortex. Les symboles correspondent aux données expérimentales et les lignes continues représentent le modèle ajusté

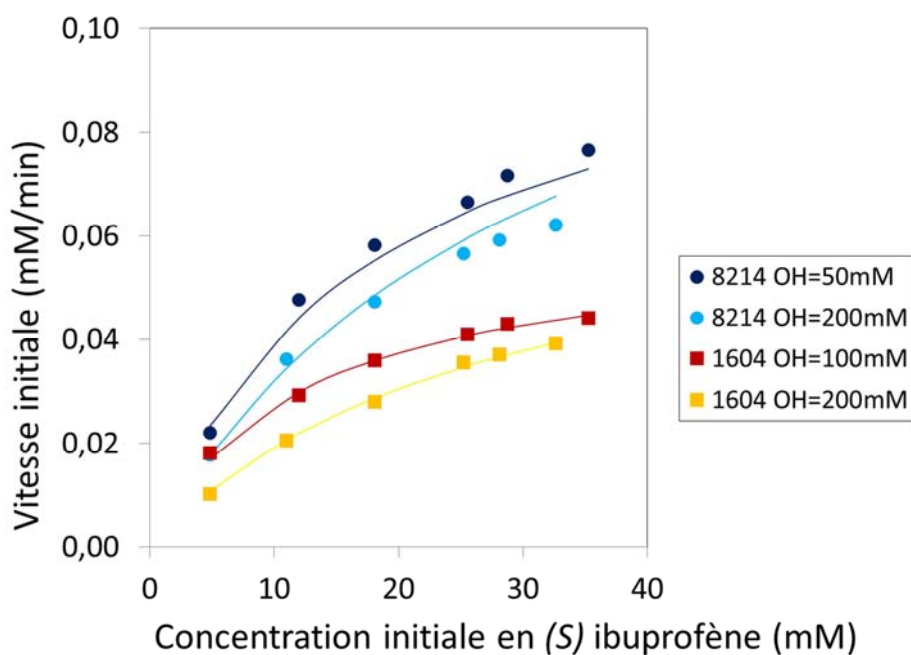


Figure 43 : Effet de la concentration initiale de (*R*, *S*) ibuprofène sur les vitesses initiales d'estérification octylique du (*S*) ibuprofène  
 Lip2p V232A est immobilisée sur les supports Purolite ECR 1604 et 8214, deux concentrations différentes d'octane-1-ol sont testées en solvant décane, en tube Eppendorf 2mL, agitateur de type vortex. Les symboles correspondent aux données expérimentales et les lignes continues représentent le modèle ajusté

Les valeurs des paramètres obtenues par ajustement selon le modèle ping-pong Bi Bi pour les deux supports sont présentées dans Tableau 17.

Tableau 17 : Modèle ping-pong Bi Bi ajusté à l'estérification du (S) ibuprofène catalysé par Lip2p V232A immobilisée sur les supports de type Purolite

	$V_{\max}$ (mmol/L.min)	$K_{Mibu}$ (mmol/L)	$K_{MOH}$ (mmol/L)	$K_i$ (mmol/L)
<b>Lip2p V232A sur Purolite ECR 8214</b>	0,14	20	15	285
<b>Lip2p V232A sur Purolite ECR 1604</b>	0,09	2,2	54	13

Le support Purolite ECR 8214 est plus efficace que le support Purolite ECR 1604 comme nous l'avons déjà constaté, la vitesse maximale est d'ailleurs 1,5 fois plus élevée pour ce support. Les unités d'enzymes immobilisées sur les supports ont été estimées à partir de la décroissance d'activité du surnageant par test *p*NPB lors du procédé d'immobilisation (cf Chapitre III, Figure 30 paragraphe 3.2.1.1, et équation 2 paragraphe 3.2.1.2). Il est possible que le site actif des enzymes immobilisées sur le support Purolite ECR 8214 soit plus accessible aux substrats. D'autre part le type de support peut avoir un rôle sur les concentrations des différents constituants avoisinant l'enzyme du fait de la composition des supports et de ce fait avoir un rôle sur les cinétiques de réaction.

Pour un modèle à quatre paramètres il n'y a peut être pas assez d'expériences pour obtenir la valeur exacte des paramètres avec le solveur.

Forts de ces résultats l'estérification octylique de l'ibuprofène peut être étudiée dans le réacteur de 90 mL en solvant décane avant de pouvoir étudier le solvant CO<sub>2</sub>SC.

#### 4.2.1.3. Estérification de l'ibuprofène en système monophasique décane dans le réacteur

L'enzyme immobilisée sur le support Purolite ECR 8214 a été testée dans le réacteur de 90 mL en solvant décane, les résultats sont présentés sur la Figure 44.



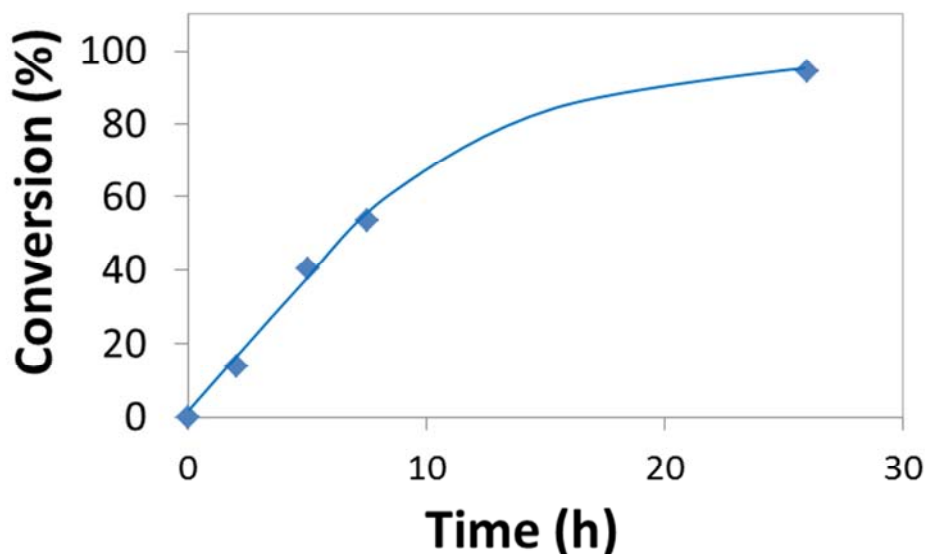


Figure 44 : Estérification octylique du (S) ibuprofène en système monophasique décane  
L'enzyme utilisée est Lip2p V232A immobilisée (0,3 g) sur Purolite 8214. Les conditions de l'expérience sont : 33 °C, agitateur magnétique 1600 tr/mn, 85 mL de décane, 200 mM octane-1-ol, 47 mM ibuprofène (le (R) ibuprofène est présent mais non estérifié par l'enzyme)

En comparaison avec le réacteur type Eppendorf (cf Figure 41), les cinétiques sont ralenties (d'un facteur 2) mais la conversion de 94 % d'estérification de l'énantiomère (S) de l'ibuprofène est obtenue après 24 h (contre 15 h en Eppendorf). Cette baisse de la cinétique pourrait être attribuée à une aire interfaciale plus faible dans le réacteur agité de 90 mL, ou à la température de 33 °C qui est peut-être moins favorable que la température ambiante pour l'activité de l'enzyme.

#### 4.2.2. Estérification de l'ibuprofène en système monophasique CO<sub>2</sub>SC

Des tests en CO<sub>2</sub>SC ont été menés, cependant, les expériences en monophasique ayant été menées tardivement, le temps a finalement manqué pour explorer en profondeur ce système. L'ibuprofène possède une solubilité dans le décane d'environ 47 mM, à température ambiante, dans le CO<sub>2</sub>SC elle est de 50 mM à 33 °C 130 bar en présence de 200 mM d'octane-1-ol, par observation visuelle dans une cellule d'observation sous pression.

Dans le cas d'une utilisation d'un système monophasique CO<sub>2</sub>, le choix du support de l'enzyme immobilisée n'est pas anodin car ce dernier peut interagir avec le CO<sub>2</sub>, en particulier si celui-ci est constitué de polymères hydrophobes dans lequel le CO<sub>2</sub> peut pénétrer en induisant un gonflement significatif. Deux supports seront testés ici, Accurel

MP1000 et Purolite ECR 1604, le support Purolite ECR 8214 n'étant plus disponible par le fournisseur.

Notons également que l'utilisation d'un système monophasique entraîne des problématiques aiguës de gestion de l'activité thermodynamique de l'eau,  $a_w$ , (la disponibilité en eau) déjà largement étudiée dans la littérature (Halling, 1990; Hobbs and Thomas, 2007) comme nous l'avons décrit dans le Chapitre I. La solubilité de l'eau dans la phase décane étant quasi nulle celui-ci extrait très peu d'eau du support portant l'enzyme et modifie donc peu l' $a_w$  à la différence de ce qui se produit en  $\text{CO}_2\text{SC}$ .

L'estérification de l'ibuprofène a déjà été effectuée en  $\text{CO}_2\text{SC}$  par une lipase immobilisée provenant de *Mucor miehei* (Lipozyme IM 20) (Rantakyla and Aaltonen, 1994) mais l'enzyme commerciale n'était pas satisfaisante d'un point de vue de l'énantiosélectivité. Dans cette étude il n'y avait pas de comparaison avec un solvant organique conventionnel. Pour une réaction de transestérification, la même enzyme avait déjà été étudiée en  $\text{CO}_2\text{SC}$  en comparaison avec le milieu organique (l'hexane) et il avait été observé une différence non négligeable en défaveur du  $\text{CO}_2\text{SC}$  (même après avoir étudié l'importance de la quantité d'eau) attribuée à l'effet du  $\text{CO}_2\text{SC}$  sur l'enzyme ou un effet intrinsèque du solvant sur le mécanisme réactionnel (Chulalaksananukul et al., 1993).

Dans notre travail, l'enzyme Lip2p V232A immobilisée sur deux supports (Accurel MP1000 et Purolite ECR 1602) a été testée, avec une agitation par barreau magnétique maximale (1500 tr/mn) ou faible (50 tr/mn), car le cisaillement est susceptible d'abimer le support. L'activité de l'eau,  $a_w$  a été fixée à 0,5 en utilisant une concentration d'eau égale à 50 % de la solubilité dans  $\text{CO}_2$  dans les conditions de l'expérience. Ceci suppose la linéarité de la courbe  $a_w = f(\text{concentration})$ . Cette approximation a été validée expérimentalement par Condoret et al., 1997. Après 100 h de réaction, la conversion maximale mesurée a été égale à 20 %. Cependant, nous avons observé une détérioration, peut être mécanique des supports après utilisation dans le réacteur. En effet à la fin de l'expérience en réacteur en  $\text{CO}_2\text{SC}$  avec le support Purolite 1604, un liquide (probablement en mélange avec l'octane-1-ol) remplaçait les petites billes supportant initialement l'enzyme était présent dans le réacteur. En fin de réaction le support Accurel MP1000 ressemblait plus à une poudre qu'à des billes. Outre les interactions physico-chimiques entre le  $\text{CO}_2$  et le support, le système de chauffe et

d'agitation ne sont peut-être pas optimaux pour une utilisation en monophasique CO<sub>2</sub>SC avec l'enzyme immobilisée. En effet il est possible que le barreau aimanté propulse l'enzyme immobilisée contre les parois du réacteur mais ne permette pas une bonne homogénéisation du milieu, et peut entraîner une dégradation mécanique du support. De plus les parois du réacteur sont les zones les plus chaudes surtout en début de réaction (cf Figure 29 du montage expérimental paragraphe 3.1 Chapitre III), une forte température pourrait désactiver une partie des enzymes. Pour éviter ce phénomène une expérimentation ou l'enzyme immobilisée serait insérée dans un dispositif en « boule thé » en rotation serait à envisager.

#### **4.2.3. Conclusion : estérification en système monophasique**

Nous avons pu montrer dans cette partie qu'en système monophasique, l'estérification éthylique de l'ibuprofène est beaucoup moins performante que l'estérification octylique.

L'utilisation de l'enzyme immobilisée en système monophasique décane en réacteur s'est avérée performante (conversion maximale de 100 % en 20 h) mais pas en CO<sub>2</sub>SC (20 % de conversion en 100 h). Il est très probable que ce soit dû au choix du support ou de l'appareillage qui méritent donc une attention particulière en CO<sub>2</sub>SC.

Afin d'éviter l'étape d'immobilisation de l'enzyme nous proposons d'effectuer la résolution de l'ibuprofène en diphasique *phase aqueuse/décane* puis *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* où l'enzyme sera alors sous forme libre, dissoute dans la phase aqueuse.

#### **4.3. Estérification de l'ibuprofène en système diphasique (*phase aqueuse/décane et phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*)**

De façon analogue à l'étude de l'estérification de l'ibuprofène en système monophasique, deux alcools sont étudiés pour l'estérification de l'ibuprofène en milieu diphasique : l'octane-1-ol, qui aura peu d'affinité avec la phase aqueuse du fait de sa longue chaîne carbonée, et l'éthanol qui aura plus d'affinité pour la phase aqueuse. De ce fait lors d'une utilisation d'un système diphasique *phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* la partition de l'alcool au sein des deux phases est à prendre en considération.

### 4.3.1. Etude du système *phase aqueuse/décane* en tube Eppendorf

#### 4.3.1.1. Précipitation de l'ibuprofène

Les premières expérimentations ont permis d'observer que, contrairement à ce qui se produit avec les formes ester étudiées (les 4 esters étudiés, l'ester octylique de l'acide 2 bromo phényl acétique, éthyl ibuprofène, l'éthyl naproxène et l'éthyl kétoprofène) une partie de l'ibuprofène précipite (environ 35 %) lorsque la phase organique contenant l'ibuprofène est placée en contact avec la phase aqueuse contenant l'enzyme, qui est en réalité une phase tamponnée correspondant au surnageant de culture. En effet en contact avec de l'eau du robinet ou de l'eau distillée, l'ibuprofène ne précipite pas (d'après un dosage par HPLC de la phase organique contenant l'ibuprofène placée en contact de tampon, d'eau du robinet ou d'eau distillée). Pour la suite de l'étude la précipitation d'une partie de l'ibuprofène n'a pas été pris en considération dans les calculs.

#### 4.3.1.2. Détermination de la quantité optimale d'alcool pour l'estérification diphasique de l'ibuprofène

Pour déterminer la quantité optimale d'alcool à utiliser pour réaliser l'estérification diphasique de l'ibuprofène, plusieurs expériences ont été menées en tube Eppendorf (exactement comme pour l'hydrolyse en diphasique du paragraphe 2.2.1 en remplaçant l'ester par l'acide et en prenant 47 mM d'ibuprofène dans la phase organique et en ajoutant l'alcool). Différentes concentrations d'alcool ont été testées (pour le calcul de la quantité d'alcool le volume de la phase dans laquelle l'alcool ira majoritairement a été utilisé, les deux phases ayant le même volume).

Concernant l'estérification éthylique une augmentation des vitesses initiales est constatée en fonction de la concentration initiale en alcool (entre 200 et 800 mM). Les vitesses initiales sont deux fois plus importantes à 600 mM qu'à 200 mM d'éthanol et légèrement plus importantes à 800 mM. Il y a peu de différence entre 800 et 1200 mM, cf Figure 45.

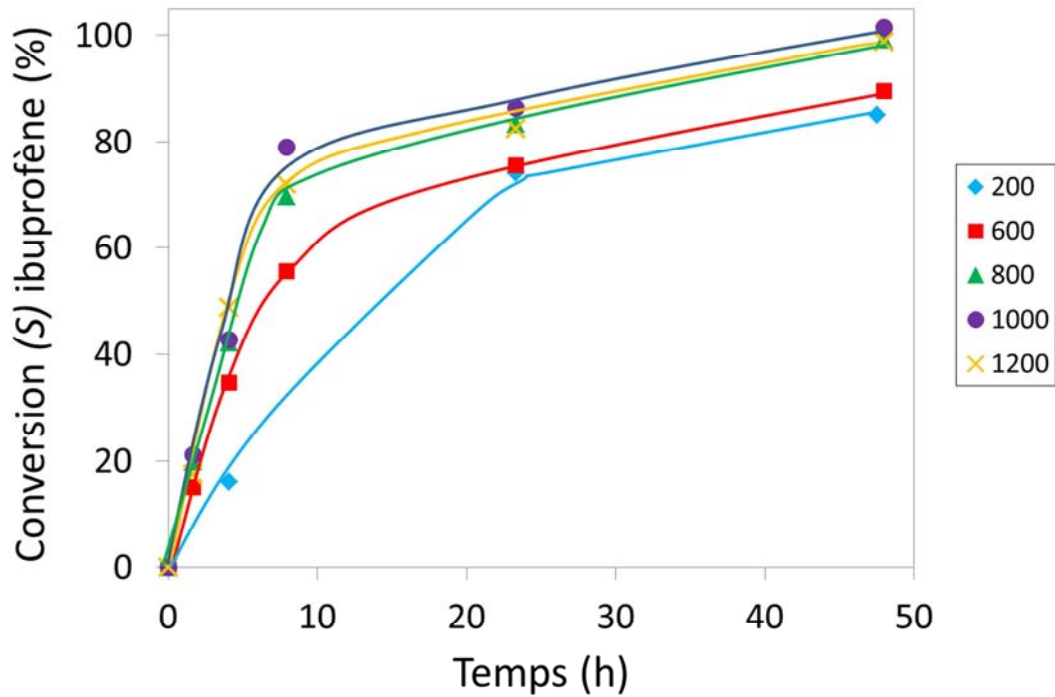


Figure 45 : Estérification éthylique du (S) ibuprofène en système diphasique *phase aqueuse/décane* en fonction de la molarité en éthanol

Avec l'enzyme Lip2p V232A. En tube Eppendorf (2 mL 750 $\mu$ L de chaque phase), température ambiante, agitateur de type vortex, 47 mM ibuprofène (le (R) ibuprofène est présent mais non estérifié par l'enzyme), molarité variable en éthanol

Concernant l'estérification octylique de l'ibuprofène les différentes concentrations en alcool testées ont eu peu d'influence sur les performances d'estérification (vitesse initiales et conversion finale), cf Figure 46. Les vitesses initiales semblent légèrement supérieure pour une concentration de 200 mM, c'est donc cette concentration qui sera utilisée par la suite.

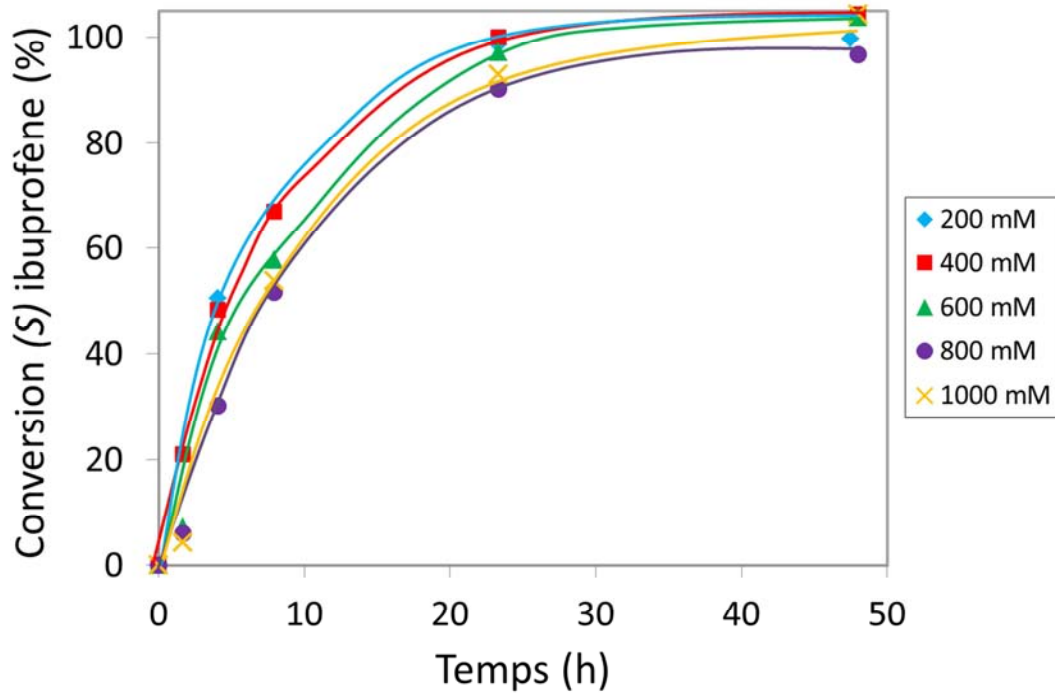


Figure 46 : Estérification octylique du (S) ibuprofène en système diphasique *phase aqueuse/décane* en fonction de la molarité en octane-1-ol

Avec l'enzyme Lip2p V232A, en tube Eppendorf (2 mL 750 $\mu$ L de chaque phase), température ambiante, agitateur de type vortex, 47 mM de (R, S) ibuprofène, molarité variable en octane-1-ol

La Figure 47 présente les résultats obtenus dans les meilleures conditions de concentrations initiales en alcool pour l'estérification de l'ibuprofène.

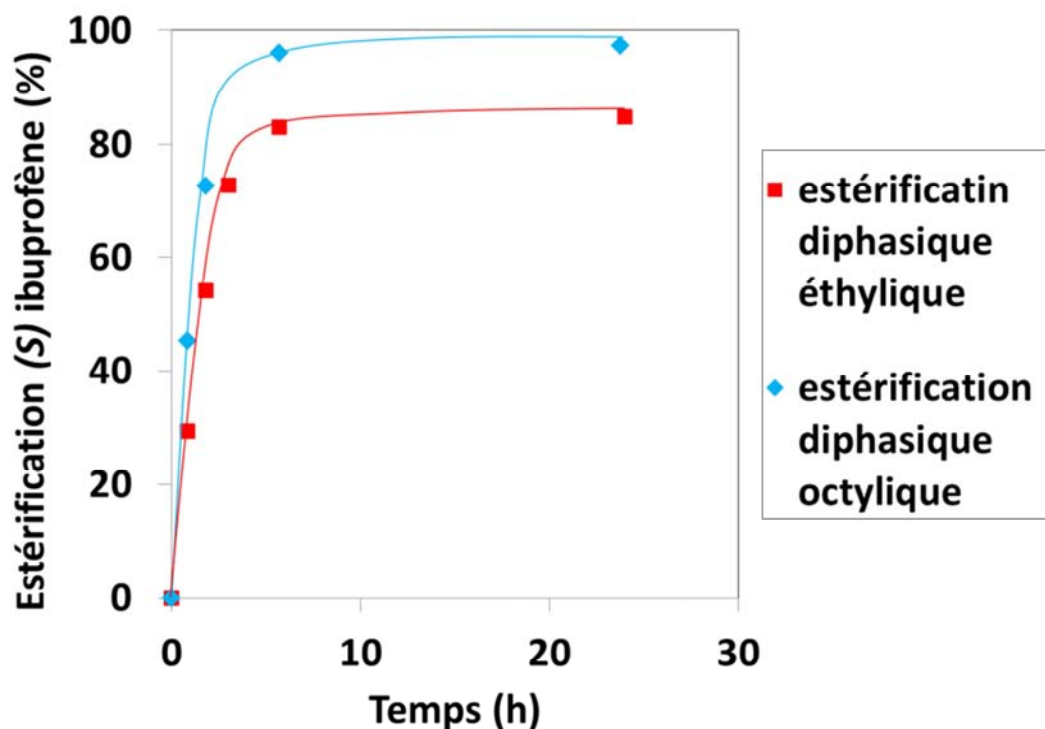


Figure 47 : Influence du type d'alcool sur l'estérification du (S) ibuprofène en diphase *phase aqueuse/décane*. 47 mM de (R, S) ibuprofène, Lip2p V232A dissoute, octane-1-ol (200 mM) vs éthanol (1000 mM) en tube Eppendorf (2 mL, 750  $\mu$ L de chaque phase) à température ambiante, agitateur de type vortex

L'estérification octylique est légèrement plus rapide et surtout quasi-totale alors que l'estérification éthylque ne l'est pas, montrant que la conversion à l'équilibre est plus faible dans le cas de l'éthanol. Cet aspect de réaction non totale a déjà été évoqué (cf Chapitre II paragraphe 2.2.4). Il a été montré dans le cas de l'estérification de l'acide oléique par le butanol que les conditions de réaction (rapport des fractions molaires de réactifs, volume des phases aqueuse et organique et nature du solvant organique) devaient être choisies pour maximiser la conversion à l'équilibre de telle sorte à maximiser l'activité de l'alcool (Scillipoti et al., 2016). Il semblerait qu'ici, du fait de son partage dans les deux phases, l'activité de l'éthanol dans le système soit plus faible que celle de l'octane-1-ol. Ce résultat pourrait être montré par une étude thermodynamique qui sort du cadre de ce travail.

L'estérification diphase (*phase aqueuse/décane*) que ce soit avec l'octane-1-ol ou l'éthanol donne des résultats prometteurs et c'est donc tout naturellement que la prochaine étape est de remplacer le décane par du  $\text{CO}_2\text{SC}$ . Cependant, afin de pouvoir comparer les performances des deux solvants en s'affranchissant de l'impact du changement d'échelle de réacteur (du tube Eppendorf vers le réacteur de 90 mL), la réaction sera d'abord réalisée dans le réacteur avec le décane.

### 4.3.2. Etude du système *phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* en réacteur

Les volumes de phase aqueuse et phase organique ou de CO<sub>2</sub>SC mis en jeu dans le réacteur seront égaux, de la même manière que précédemment (45 mL de phase aqueuse seront utilisées dans le réacteur, cf Chapitre III 3.3).

#### 4.3.2.1. Estérification éthylique de l'ibuprofène

La Figure 48 présente les résultats de l'estérification éthylique en diphasique *phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*. Dans les deux cas, la phase aqueuse est supplémentée en sel bien sûr pour maintenir le pH aux alentours de 6-7 lorsque cette phase est en contact avec le CO<sub>2</sub> (cf Chapitre III paragraphe 3.3.2).

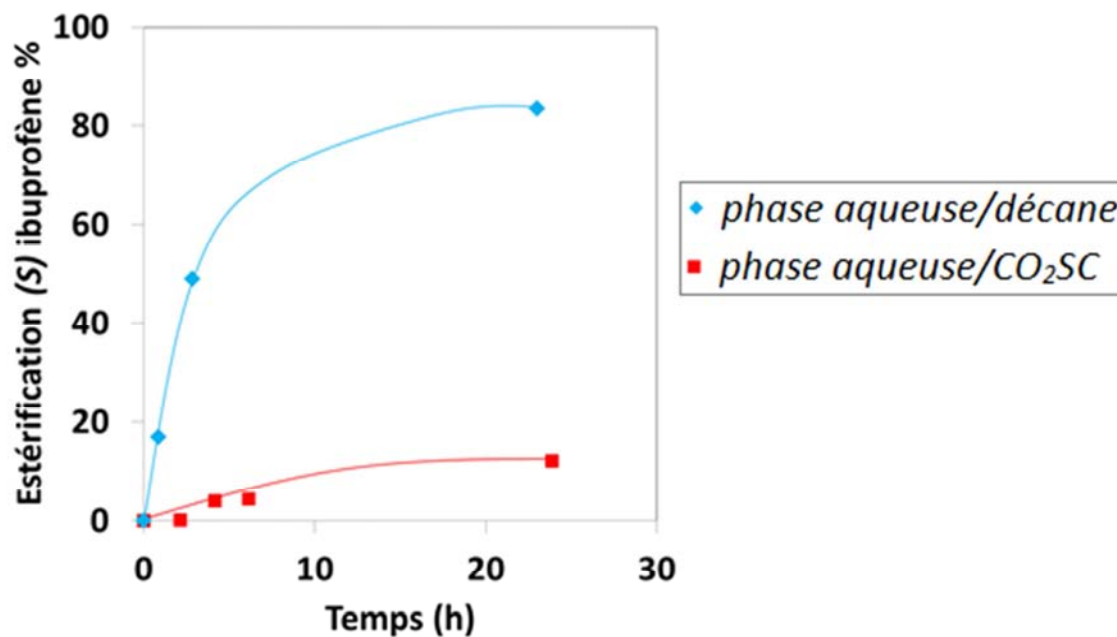


Figure 48 : Estérification éthylique de l'ibuprofène par Lip2p V232A en système diphasique *phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*  
 33 °C, 1000 mM de sels (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7), 0 ou 120 bar, agitateur magnétique 1600 tr/mn, 45 mL de chaque phase, la phase aqueuse est le surnageant de culture de *Y. lipolytica* qui contient Lip2p V232A, 1 M d'éthanol 47 mM de (R, S) ibuprofène, réacteur de 90 mL

En système *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*, à 120 bar, les vitesses sont très faibles (environ 10 % de conversion seulement en 48 h) alors qu'en système *phase aqueuse/décane* les résultats sont comparables à ceux obtenus en tubes (la température, le système de chauffe et d'agitation étant différents).



Ces résultats semblent montrer ici encore l'effet négatif du CO<sub>2</sub> sur l'activité de l'enzyme. Il aurait été intéressant de comprendre les raisons de ces faibles conversions, l'éthanol pouvant jouer un rôle sur la polarité du solvant et n'ayant peut être pas la même partition au sein des phases lorsqu'il s'agit d'un système *phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*. Cela peut jouer un rôle sur les cinétiques ou bien sur l'équilibre thermodynamique. Cependant, par manque de temps ce travail n'a pu être réalisé ici et nous avons privilégié l'étude de l'autre alcool, l'octane-1-ol.

### 4.3.2.2. Estérification octylique de l'ibuprofène

La situation est très différente dans le cas de l'estérification octylique de l'ibuprofène toujours en système diphasique, comme le montrent les résultats de la Figure 49. En effet il y a toujours une différence entre les cinétiques des deux systèmes étudiés, elles sont plus rapides dans le système *phase aqueuse/décane*, et la conversion du (*S*) ibuprofène vers l'ester octylique (*S*) est importante dans les deux systèmes. De même que ce nous avons observé pour l'hydrolyse de l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique (cf Chapitre III paragraphe 3.3) la réaction ne s'arrête pas ce qui atteste d'une stabilité de l'enzyme dans les conditions étudiées, une conversion équivalente à celle obtenue en diphasique *phase aqueuse/décane* peut ainsi être obtenue en environ 80 h (contre 6 h avec le décane). Dans ce cas également, la cinétique est défavorisée par l'utilisation du CO<sub>2</sub>.

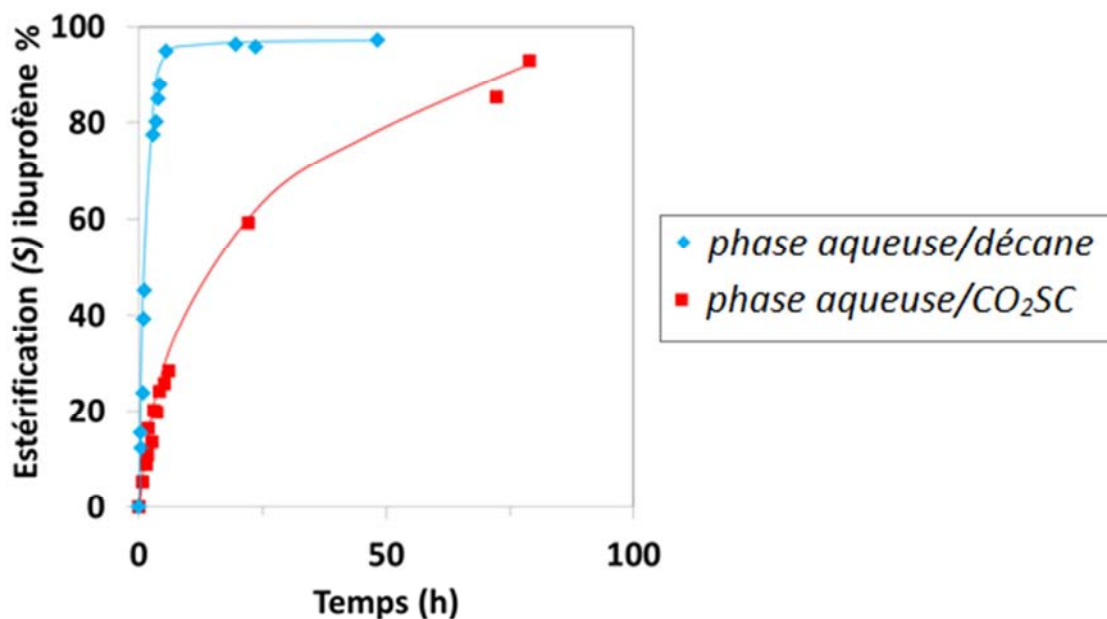


Figure 49 : Estérification octylique de l'ibuprofène par Lip2p V232A en système diphasique *phase aqueuse/décane* et *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*

33 °C, 1000 mM de sels (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7), 0 ou 120 bar agitateur magnétique 1600 tr/mn, 45 mL de chaque phase, la de phase aqueuse est le surnageant de culture de *Y. lipolytica* qui contient Lip2p V232A, 200 mM d'octanol 47 mM de (R, S) ibuprofène

#### 4.3.3. Conclusion : estérification en système diphasique

L'estérification en *phase aqueuse/décane* de l'ibuprofène permet l'utilisation du surnageant de culture (sans avoir à immobiliser l'enzyme) et, que ce soit avec l'éthanol ou l'octane-1-ol les taux de conversion finaux de l'acide et les vitesses de réaction sont satisfaisants. L'utilisation d'éthanol est tout de même moins conseillée que celle de l'octane-1-ol et c'est certainement à mettre en relation avec leur partition entre les deux phases, l'éthanol est très majoritairement dans la phase aqueuse alors que l'octane-1-ol est majoritairement dans la phase organique. En système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* l'estérification octylique de l'ibuprofène permet d'atteindre des taux de conversion équivalents à ceux obtenus avec le décane bien que les cinétiques soient plus lentes.

#### 4.4. Comparaison systèmes monophasique et diphasique pour l'estérification de l'ibuprofène

L'estérification éthylique en milieu système monophasique décane n'a pas été satisfaisante, en terme de conversion, dans les conditions testées, donc, pour ce type d'estérification, le système diphasique s'est révélé le plus efficace.

L'estérification octylique en système diphasique *phase aqueuse/décane* et en système monophasique décane en tube Eppendorf est comparée sur la Figure 50, le système diphasique utilisant l'enzyme sous forme libre, dissoute dans la phase aqueuse, alors que le système monophasique a été étudié avec l'enzyme immobilisée sur support Accurel. On constate que des performances de réaction sont de façons très surprenantes extrêmement similaires dans les deux cas.

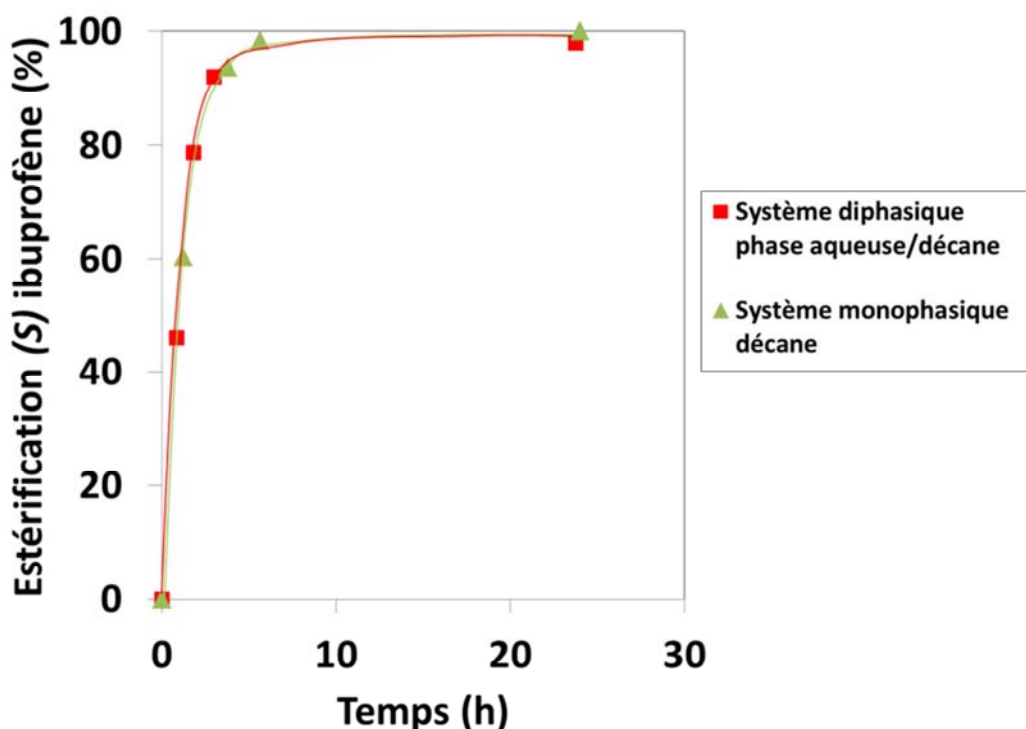


Figure 50 : Estérification octylique de l'ibuprofène en système diphasique *phase aqueuse/décane* ou en système monophasique décane

Lip2p V232A dissoute dans la phase aqueuse en système diphasique et immobilisée sur le support Accurel MP1000, 20 U/mL en système monophasique. 47 mM de (R, S) ibuprofène, 200 mM d'octane-1-ol, température ambiante, 750  $\mu$ L de décane, Eppendorf (2 mL), 750  $\mu$ L de phase aqueuse pour le système diphasique, agitateur de type vortex

En réacteur de 90 mL, avec le solvant CO<sub>2</sub>SC la situation est toute autre car les résultats obtenus en monophasique CO<sub>2</sub>SC sont faibles (en terme de conversion, 20 % en 100 h) alors qu'en système diphasique les conversions sont satisfaisantes. Comme discuté dans le paragraphe 4.2.2 le réacteur n'est peut-être pas adapté à une utilisation en monophasique CO<sub>2</sub>SC d'une part du point de vue de l'agitation, également à cause du système de chauffe et les supports testés sont peut-être inadaptés à une utilisation en CO<sub>2</sub>SC. Dans les conditions testées le système diphasique s'est donc montré très intéressant pour effectuer une réaction d'estérification, la grande quantité d'eau dans ce genre de système n'est donc pas un paramètre déterminant d'un point de vue de l'équilibre thermodynamique.

#### 4.5. Conclusion Chapitre IV

Dans ce chapitre l'estérification de l'ibuprofène a été étudiée en système monophasique (décane ou CO<sub>2</sub>SC) et diphasique (*phase aqueuse/décane* ou *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*). De plus deux alcools ont été étudiés : l'éthanol et l'octane-1-ol.

En système monophasique l'estérification éthylique présente de très faibles taux de conversion. L'estérification octylique en système monophasique décane de l'ibuprofène avec l'enzyme immobilisée est nettement plus performante et atteint des taux de conversion proches de 100 %. L'utilisation de l'enzyme immobilisée pour l'estérification octylique de l'ibuprofène en système monophasique CO<sub>2</sub>SC n'a pas permis des taux de conversion élevés dans les conditions expérimentales testées. Il est très probable que ce soit dû au choix du support ou de l'appareillage qui n'étaient pas adaptés à une utilisation en CO<sub>2</sub>SC.

L'estérification diphasique *phase aqueuse/décane* de l'ibuprofène permet l'utilisation directe du surnageant de culture. Que ce soit avec l'éthanol ou l'octane-1-ol les taux de conversion finaux de l'acide et les vitesses de réaction sont satisfaisantes en diphasique *phase aqueuse/décane*. En système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* seule l'estérification octylique a permis d'atteindre des taux de conversions importants en 100 h (>90 %) bien que les cinétiques soient plus lentes qu'en système *phase aqueuse/décane*.



# **Conclusion et Perspectives**



## Conclusion générale

Durant ces trois années de thèse mon travail s'est articulé autour de l'ingénierie de la lipase Lip2p de *Yarrowia lipolytica* et de sa mise en œuvre en utilisant un solvant original, le dioxyde de carbone supercritique (CO<sub>2</sub>SC).

L'objectif est la séparation des énantiomères de molécules à intérêt pharmaceutique car bien souvent un seul des deux énantiomères possède l'activité recherchée. En effet la séparation des composés d'un mélange racémique est une nécessité actuelle pour les industries pharmaceutiques afin de s'affranchir d'éventuels effets indésirables de l'énantiomère non actif. Les molécules d'intérêt sont des acides 2-substitués dont trois appartenant à la famille des profènes, l'ibuprofène, le naproxène et le kétoprofène et le dernier étant l'acide 2-bromo phényl acétique, un intermédiaire réactionnel impliqué dans la synthèse d'un médicament. Pour effectuer la séparation des énantiomères la catalyse enzymatique est la voie envisagée, pour substituer aux techniques habituelles de séparation souvent coûteuses comme par exemple la chromatographie chirale.

La première partie de ce travail a consisté à identifier des enzymes suffisamment énantiosélectives envers l'ibuprofène, le naproxène et le kétoprofène ( $E > 200$ ). Deux enzymes, une possédant une énantio-préférence (*S*) (Bordes et al., 2009) et l'autre (*R*) (Cambon et al., 2010a), remplissant les conditions étaient déjà connues avant ce travail concernant l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique. La première stratégie consistait à améliorer la lipase Lip2p de *Y. lipolytica* par ingénierie enzymatique ciblée sur le site actif de l'enzyme et assise sur la modélisation moléculaire. Cette stratégie a été fructueuse puisqu'une enzyme pour chaque substrat avec une énantiosélectivité suffisante a été trouvée. A savoir Lip2p V232A pour l'ibuprofène, V235S pour le naproxène, toutes deux préférant l'énantiomère (*S*), et V232F pour le kétoprofène préférant l'énantiomère (*R*). Les lipases de *Candida rugosa* sont elles aussi prometteuses d'après la littérature (Lee et al., 1995; Piamtongkam et al., 2011; Xin et al., 2005), certaines isoenzymes se sont avérées intéressantes (énantiosélectivité  $> 200$ ) pour la résolution de l'ibuprofène, du naproxène (CRL1) et du kétoprofène (CRL1 et CRL4) mais moins que les lipases précédemment évoquées d'un point de vue cinétique.



La deuxième stratégie qui a été employée consistait à créer puis tester une banque d'enzymes homologues à des lipases déjà connues dans la littérature, prometteuses pour les substrats d'intérêt. C'est cette méthode qui a permis notamment la découverte d'une carboxylestérase provenant de la bactérie *Alcanivorax borkumensis*, efficace ( $E > 200$ ) pour la résolution du kétoprofène.

Une fois les enzymes trouvées le second objectif a été de remplacer par le dioxyde de carbone supercritique le solvant organique utilisé pour faire la résolution. Deux des quatre substrats ont été étudiés dans ce solvant, l'ester octylique de l'acide 2-bromo phényl acétique (et l'acide associé) et l'ibuprofène.

Deux stratégies ont été employées pour la résolution de ces substrats dans le cadre de ce remplacement de solvant : la première stratégie a consisté à utiliser un système monophasique ( $\text{CO}_2\text{SC}$ ). Dans ce cas l'enzyme doit être immobilisée, et la réaction étudiée est alors une estérification. C'est la stratégie la plus utilisée en  $\text{CO}_2\text{SC}$  mais cette approche nécessite d'une part un contrôle de l' $a_w$  (activité de l'eau, disponibilité en eau) mais aussi un support portant l'enzyme adapté à une utilisation en  $\text{CO}_2$ . Dans ce travail nous avons mis en évidence que cette stratégie n'était pas concluante avec plusieurs explications envisagées i) l'équilibre thermodynamique qui ne permet pas une réaction totale (et même parfois de très faibles conversions) ii) l'appareillage ou bien iii) le support portant l'enzyme qui n'était pas adapté à une réaction en  $\text{CO}_2\text{SC}$  (Chapitre IV). Toutefois avant d'exclure cette stratégie, de plus amples expérimentations devraient être menées.

La deuxième stratégie consiste à utiliser un système diphasique (*phase aqueuse*/ $\text{CO}_2\text{SC}$ ). Cette stratégie a nécessité de faire des adaptations nécessaires à l'emploi du  $\text{CO}_2$ . En effet en système diphasique avec l'eau la formation d'acide carbonique provoque une baisse du pH, néfaste pour l'activité de la lipase. Pour pallier à cet inconvénient, l'ajout d'un tampon pH dans la phase aqueuse a été testé. Cette adaptation a permis d'obtenir des conversions acceptables et une bonne énantiosélectivité mais n'a pas été suffisante pour que le système avec le  $\text{CO}_2\text{SC}$  soit compétitif avec le système classique avec le solvant organique (le décane) du point de vue cinétique. Deux explications ont été proposées :

- la formation de carbamates due à l'interaction entre le  $\text{CO}_2$  et les acides aminés de l'enzyme.

- ou alors une contrainte due à l'ouverture du volet moléculaire qui permet l'accessibilité du site actif au substrat impactée par l'hydrophilicité du CO<sub>2</sub>SC.

Cette cinétique plus lente n'est cependant pas rédhibitoire pour l'utilisation d'un solvant comme le CO<sub>2</sub>, en particulier si l'on considère les gains potentiels sur la purification post-réactionnelle (qui n'a pas été abordée dans ce travail).



## Perspectives

La biologie moléculaire a été employée pour améliorer la sélectivité et l'activité de l'enzyme vis-à-vis des substrats d'intérêt. D'autres améliorations de l'enzyme sont envisageables en utilisant la biologie moléculaire :

- Une meilleure thermostabilité, cela a d'ailleurs déjà été étudié pour la lipase Lip2p de *Y. lipolytica* (Bordes et al., 2011; Wen et al., 2012) ; Un fonctionnement sous température plus élevée serait très certainement bénéfique du point de vue cinétique.
- Une meilleure stabilité et/ou d'activité envers le pH, ce qui serait très utile par la suite pour le système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* et permettrait de s'affranchir de l'utilisation de concentrations élevées de sels et peut-être améliorer la cinétique dans cette configuration.
- Une immobilisation plus performante. Il est envisageable d'insérer des sites de fixation spécifique pour une immobilisation orientée de l'enzyme, par exemple grâce à l'introduction d'une cystéine à un endroit précis de la séquence d'acides aminés qui permettrait la création de ponts disulfure avec le support ; (Godoy et al., 2013; Hernandez and Fernandez-Lafuente, 2011; Kim et al., 2008; Simons et al., 2013)
- Etc

Les enzymes n'étaient pas étudiées dans les conditions optimales, une recherche de ces conditions serait intéressante.

Lors de l'étude en réacteur il a souvent été difficile de déterminer la cause des faibles taux de conversions observés dans différentes configurations, trois causes étant impliquées :

- la thermodynamique
- la cinétique
- la stabilité de l'enzyme

Une étude récente propose de calculer les équilibres thermodynamiques en s'aidant de la modélisation. Il aurait été intéressant dans chacun des cas où le taux de conversion n'était pas de 100 % de calculer l'équilibre thermodynamique (Scillipoti et al., 2016).

D'autre part l'explication des différences observées entre le solvant organique et le CO<sub>2</sub>SC devra être confirmée. Dans le cas de l'implication de l'ouverture du volet moléculaire en rapport avec la polarité, la modélisation moléculaire pourrait être intéressante pour mettre en évidence théoriquement ce phénomène. Egalement, l'utilisation de la lipase de *Candida antarctica* qui ne possède pas de volet moléculaire serait un moyen de valider cette hypothèse. Dans le cas où ce sont les carbamates qui seraient à l'origine des différences, il faudrait envisager la modélisation moléculaire de l'enzyme en présence de CO<sub>2</sub> pour déterminer quelles enzymes ne seraient pas impactées par ces carbamates.

Le grand intérêt à l'utilisation du CO<sub>2</sub>SC est bien entendu la purification après réaction. La mise en œuvre de la séparation post réactionnelle serait une étape clef pour mettre en lumière cet avantage. L'intérêt d'un procédé en continu a déjà été étudié en système diphasique pour un bioprocédé mettant en œuvre une lipase (Elgue et al., 2014), le CO<sub>2</sub>SC ne faisait pas partie de cette étude mais serait envisageable et aurait un grand intérêt pour l'intensification de procédé. Egalement, Nioi et al., 2015 ont récemment proposé l'utilisation d'appareillages de Chromatographie de Partage Centrifuge comme réacteur enzymatique diphasique continu. Bien que cela n'ait pas encore été proposée, une utilisation de cet appareillage avec du CO<sub>2</sub>SC serait une option très prometteuse à tester. Des procédés en CO<sub>2</sub>SC proposant une réaction suivie d'une séparation des réactifs et produit ont d'ailleurs déjà été étudiés (Paiva et al., 2011; Rezaei and Temelli, 2001).

Si l'on considère plus largement l'opération de résolution énantiomérique, le rendement d'une réaction de séparation des énantiomères dans un mélange racémique est par essence limité à 50 %. En effet seul l'un des énantiomères peut être transformé en produit d'intérêt. Pour pallier cette limitation une racémisation in-situ de l'énantiomère qui n'est pas transformé a été étudiée dans la littérature (Akai et al., 2006; Chang et al., 1999; Choi et al., 2004; Fazlena et al., 2006; Lau et al., 2010; Xin et al., 2001). Il serait intéressant de réaliser ce genre d'étude dans les conditions utilisées lors de cette thèse (système diphasique, CO<sub>2</sub>SC, Lip2p de *Y. lipolytica* et les substrats d'intérêt).

En ce qui concerne les évolutions technologiques des systèmes utilisés dans ce travail, on peut penser que le système d'ajustement du pH, dans le cas d'un système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC*, pourrait être amélioré, par exemple avec un ajustement par ajout de base

dans le réacteur en remplacement des sels, dans ce cas un système d'injection sous pression est nécessaire.

Enfin, dans le cas du système monophasique, la mise en œuvre pourrait être grandement améliorée, premièrement en proposant un support inerte vis-à-vis du CO<sub>2</sub> et/ou en développant un appareillage plus adapté, par exemple pour éviter la détérioration thermique ou mécanique du support. Une expérimentation où l'enzyme immobilisée serait insérée dans un dispositif en « boule à thé » en rotation serait peut être une solution simple et efficace.

Pour finir, ce travail a montré l'intérêt des enzymes pour effectuer la résolution d'un mélange racémique. Deux méthodes ont été employées pour diriger la recherche d'enzymes énantiosélectives :

- La biologie moléculaire permettant l'amélioration des propriétés d'enzymes connues
- La construction d'une banque d'enzymes par comparaison de séquences avec des enzymes déjà identifiées comme potentiellement intéressantes.

La mise en œuvre d'enzymes énantiosélectives a été effectuée dans un solvant original, le dioxyde de carbone à l'état supercritique. De plus ce solvant a été utilisé en système diphasique *phase aqueuse/CO<sub>2</sub>SC* ce qui permet l'utilisation d'enzymes libres, dissoutes dans la phase aqueuse. Les taux de conversion de la résolution d'un mélange racémique, que ce soit pour l'hydrolyse de l'acide 2-bromo phényl acétique octyl ester ou pour l'estérification octylique de l'ibuprofène sont très satisfaisants (>90 % de l'énantiomère transformé). Les cinétiques de réactions doivent en revanche être améliorées. La séparation post-réactionnelle des composés doit être réfléchi afin de pouvoir envisager ce type de procédé en substitution des méthodes classiques de résolution d'un mélange racémique.



# Références





---

## Références

Adams, S.S., Bresloff, P., Mason, C.G., 1976. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer. *J. Pharm. Pharmacol.* 28, 256–7.

Agranat, I., Caner, H., Caldwell, J., 2002. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 753–768.

Agranat, I., Wainschtein, S.R., Zusman, E.Z., 2012. The predicated demise of racemic new molecular entities is an exaggeration. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 972–973.

Akai, S., Tanimoto, K., Kanao, Y., Egi, M., Yamamoto, T., Kita, Y., 2006. A dynamic kinetic resolution of allyl alcohols by the combined use of lipases and [VO(OSiPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45, 2592–2595.

Akoh, C.C., Lee, G.C., Liaw, Y.C., Huang, T.H., Shaw, J.F., 2004. GDSE family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* 43, 534–552.

Bae, H.A., Lee, K.W., Lee, Y.H., 2006. Enantioselective properties of extracellular lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of (*S*)-flurbiprofen. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 40, 24–29.

Battistel, E., Bianchi, D., Cesti, P., Pina, C., 1991. Enzymatic resolution of (*S*)-(+)-Naproxen in a continuous reactor. *Biotechnol Bioeng* 38, 659–664.

Behrouz, M., O. Balaban, M., Arthur, A.T., 1992. Prediction of pH in model systems pressurized with carbon dioxide. *Biotechnol Prog* 8, 149-154.

Bhatia, S., Long, W.S., Kamaruddin, A.H., 2004. Enzymatic membrane reactor for the kinetic resolution of racemic ibuprofen ester: Modeling and experimental studies. *Chem. Eng. Sci.* 59, 5061–5068.

Blattner, C., Zoumpantioti, M., Kröner, J., Schmeer, G., Xenakis, A., Kunz, W., 2006. Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 36, 182–193.

- Boettner, M., Prinz, B., Holz, C., Stahl, U., Lang, C., Fang, H.H., Yu, H., 2002. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 99, 51–62.
- Bordes, F., Barbe, S., Escalier, P., Mourey, L., André, I., Marty, A., Tranier, S., 2010. Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biophys. J.* 99, 2225–2234.
- Bordes, F., Cambon, E., Dossat-Létisse, V., André, I., Croux, C., Nicaud, J.M., Marty, A., 2009. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site. *ChemBioChem* 10, 1705–1713.
- Bordes, F., Fudalej, F., Dossat, V., Nicaud, J.-M., Marty, A., 2007. A new recombinant protein expression system for high-throughput screening in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Microbiol. Methods* 70, 493–502.
- Bordes, F., Tarquis, L., Nicaud, J.M., Marty, A., 2011. Isolation of a thermostable variant of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* by directed evolution and deeper insight into the denaturation mechanisms involved. *J. Biotechnol.* 156, 117–124.
- Botta, M., Cernia, E., Corelli, F., Manetti, F., Soro, S., 1997. Probing the substrate specificity for lipases. II. Kinetic and modeling studies on the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1337, 302–310.
- Bouisset, M., Radisson, J., 1991. Process for preparing phenylacetic derivatives of thienopyridines and intermediates alpha-bromo-phenylacetic acids.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U., 1990. A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase. *Nature* 343, 767–770.
- Brígida, A.I.S., Amaral, P.F.F., Coelho, M. a Z., Gonçalves, L.R.B., 2014. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101, 148–158.

- Brocca, S., Grandori, R., Breviario, D., Lotti, M., 1995. Localization of lipase genes on *Candida rugosa* chromosomes. *Curr. Genet.* 28, 454–457.
- Brzozowski, a. M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. a., Thim, L., 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*.
- Buchholz, K., Kasche, V., 2006. Biocatalysts and enzyme technology. *Focus Catal.* 2006, 8.
- Caixia, A., Nan, C., Chen, G., Biqiang, X., Tan, T., 2016. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase Ylip 2 for the biocatalytic synthesis of phytosterol ester in a water activity controlled reactor. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*.
- Cambon, E., Piamtongkam, R., Bordes, F., Duquesne, S., André, I., Marty, A., 2010a. Rationally engineered double substituted variants of *Yarrowia Lipolytica* lipase with enhanced activity coupled with highly inverted enantioselectivity towards 2-bromo phenyl acetic acid esters. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 852–859.
- Cambon, E., Piamtongkam, R., Bordes, F., Duquesne, S., Laguerre, S., Nicaud, J.M., Marty, A., 2010b. A new *Yarrowia lipolytica* expression system: An efficient tool for rapid and reliable kinetic analysis of improved enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 47, 91–96.
- Cancino, M., Bauchart, P., Sandoval, G., Nicaud, J., André, I., Dossat, V., Marty, A., 2008. A variant of *Yarrowia lipolytica* lipase with improved activity and enantioselectivity for resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron : Asymmetry* 19, 1608–1612.
- Casas-Godoy, L., Marty, A., Sandoval, G., Ferreira-Dias, S., 2013. Optimization of medium chain length fatty acid incorporation into olive oil catalyzed by immobilized Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Biochem. Eng. J.* 77, 20–27.
- Casas-Godoy, L., Meunchan, M., Cot, M., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., 2014. *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2: An efficient enzyme for the production of concentrates of docosahexaenoic acid ethyl ester. *J. Biotechnol.* 180, 30–36.
- Celebi, N., Yildiz, N., Demir, A.S., Calimli, A., 2007. Enzymatic synthesis of benzoin in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 41, 386–390.

- Ceynowa, J., Rauchfleisz, M., 2003. High enantioselective resolution of racemic 2-arylpropionic acids in an enzyme membrane reactor. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 23, 43–51.
- Chang, C.S., Tsai, S.-W., 1997. A facile enzymatic process for the preparation of (*S*) Naproxen ester prodrug in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 635–639.
- Chang, C.S., Tsai, S.W., Kuo, J., 1999. Lipase-catalyzed dynamic resolution of naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester by hydrolysis in isooctane. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 120–126.
- Chang, C.S., Tsai, S.W., Lin, C.N., 1998. Enzymatic resolution of (*RS*)-2-arylpropionic acid thioesters by *Candida rugosa* lipase-catalyzed thiotransesterification or hydrolysis in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry* 9, 2799–2807.
- Chen, C.C., Tsai, S.W., Villeneuve, P., 2005. Enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl ester in water-saturated solvents via lipases from *Carica pentagona* Heilborn and *Carica papaya*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 34, 51–57.
- Choi, J.H., Choi, Y.K., Kim, Y.H., Park, E.S., Kim, E.J., Kim, M.J., Park, J., 2004. Aminocyclopentadienyl Ruthenium Complexes as Racemization Catalysts for Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols at Ambient Temperature. *J. Org. Chem.* 69, 1972–1977.
- Chulalaksananukul, W., Condoret, J.-S., Combes, D., 1993. Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 691–698.
- Ciftci, O.N., Temelli, F., 2013. Enzymatic conversion of corn oil into biodiesel in a batch supercritical carbon dioxide reactor and kinetic modeling. *J. Supercrit. Fluids* 75, 172–180.
- Ciou, J.F., Wang, P.Y., Wu, A.C., Tsai, S.W., 2011. Lipase-catalyzed alcoholic resolution of (*R,S*)-flurbiprofenyl azolides for preparation of (*R*)-NO-flurbiprofen ester prodrugs. *Process Biochem.* 46, 960–965.
- Coimbra, P., Duarte, C.M.M., De Sousa, H.C., 2006. Cubic equation-of-state correlation of the solubility of some anti-inflammatory drugs in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib.* 239, 188–199.

- Condoret, J.S., Vankan, S., Joulia, X., Marty, A., 1997. Prediction of water adsorption curves for heterogeneous biocatalysis in organic and supercritical solvents. *Chem. Eng. Sci.* 52, 213–220.
- Crosby, J., 1992. In *chirality in industry: the commercial manufacture and applications of optically active compounds*. Chirality Ind. 2–66.
- Cui, C., Tao, Y., Li, L., Chen, B., Tan, T., 2013. Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 91, 59–66.
- Cygler, M., Grochulskui, P., Kazlauskas, R., Schrag, J.D., Bouthiller, F., Rubin, B., Serreqi, a, Gupta, K., 1994. A structural basis for the Chiral Preferences of Lipases. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 3180–3186.
- De Melo, M.M.R., Silvestre, a. J.D., Silva, C.M., 2014. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J. Supercrit. Fluids* 92, 115–176.
- De Oliveira, D., Feihmann, A.C., Dariva, C., Cunha, A.G., Bevilaqua, J. V., Destain, J., Oliveira, J.V., Freire, D.M.G., 2006. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 39, 117–123.
- Derewenda, Z.S., Derewenda, U., Dodson, G.G., 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227, 818–839.
- Dijkstra, Z.J., Merchant, R., Keurentjes, J.T.F., 2007. Stability and activity of enzyme aggregates of Calb in supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 41, 102–108.
- Domínguez De María, P., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J. V., Alcántara, A.R., 2006. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* 24, 180–196.
- Dossat, V., Combes, D., Marty, A., 2002. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 90–94.
- Ducret, a, Trani, M., Pepin, P., Lortie, R., 1998. Chiral high performance liquid chromatography resolution of ibuprofen esters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16, 1225–1231.

- Eijkmann, C., 1901. Über enzyme bei bakterien und schimmelpilzen. zentralbl bakt. Parasitenkd Infekt. 29, 841–848.
- Eisenmenger, M.J., Reyes-De-Corcuera, J.I., 2009. High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 331–347.
- Elend, C., Schmeisser, C., Hoebenreich, H., Steele, H.L., Streit, W.R., 2007. Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (*R*)-ibuprofen esters. *J. Biotechnol.* 130, 370–377.
- Elgue, S., Conté, A., Marty, A., Condoret, J.S., 2014. Continuous lipase esterification using process intensification technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1590–1598.
- Erb, S., 2006. Single-Enantiomer Drugs Poised for Further Market Growth. *Pharm. Technol.* 30, s14–s18.
- Fazlena, H., Kamaruddin, a. H., Zulkali, M.M.D., 2006. Dynamic kinetic resolution: Alternative approach in optimizing *S*-ibuprofen production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 28, 227–233.
- Ferrato, F., Carriere, F., Sarda, L., Verger, R., 1997. A Critical Reevaluation of the Phenomenon of Interfacial Activation 286, 327–347.
- Fickers, P., Fudalej, F., Le Dall, M.T., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P., Nicaud, J.M., 2005. Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 264–274.
- Fickers, P., Marty, A., Nicaud, J.M., 2011. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 29, 632–644.
- Fickers, P., Nicaud, J.M., Destain, J., Thonart, P., 2003. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 136–142.
- Fischer, M., Thai, Q.K., Grieb, M., Pleiss, J., 2006. DWARF--a data warehouse system for analyzing protein families. *BMC Bioinformatics* 7, 495.

- Gaßmeyer, S.K., Wetzig, J., Mügge, C., Assmann, M., Enoki, J., Hilterhaus, L., Zuhse, R., Miyamoto, K., Liese, A., Kourist, R., 2016. Arylmalonate Decarboxylase-Catalyzed Asymmetric Synthesis of Both Enantiomers of Optically Pure Flurbiprofen. *ChemCatChem* 8, 916–921.
- Godoy, C. a., Romero, O., De Las Rivas, B., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Palomo, J.M., 2013. Changes on enantioselectivity of a genetically modified thermophilic lipase by site-directed oriented immobilization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 87, 121–127.
- Guieysse, D., Salagnad, C., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2003a. Lipase-catalyzed enantioselective transesterification toward esters of 2-bromo-tolylacetic acids. *Tetrahedron Asymmetry* 14, 317–323.
- Guieysse, D., Salagnad, C., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2001. Resolution of 2-bromo-*o*-tolyl-carboxylic acid by transesterification using lipases from *Rhizomucor miehei* and *Pseudomonas cepacia*. *Tetrahedron Asymmetry* 12, 2473–2480.
- Guieysse, D., Salagnad, C., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Tran, V., 2003b. Towards a novel explanation of *Pseudomonas cepacia* lipase enantioselectivity via molecular modelling of the enantiomer trajectory into the active site. *Tetrahedron Asymmetry* 14, 1807–1817.
- Guieysse, D., Sandoval, G., Faure, L., Nicaud, J.M., Monsan, P., Marty, A., 2004. New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron Asymmetry* 15, 3539–3543.
- Habibi, Z., Mohammadi, M., Yousefi, M., 2013. Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. *Process Biochem.* 48, 669–676.
- Habulin, M., Knez, Ž., 2001. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 1260–1266.
- Habulin, M., Šabeder, S., Knez, Ž., 2008a. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. *J. Supercrit. Fluids* 45, 338–345.



- Habulin, M., Šabeder, S., Sampedro, M.A., Knez, Ž., 2008b. Enzymatic synthesis of citronellol laurate in organic media and in supercritical carbon dioxide. *Biochem. Eng. J.* 42, 6–12.
- Halling, P.J., 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 178–206.
- Halling, P.J., 1990. High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1040, 225–228.
- Halling, P.J., 1987. Biocatalysis in multi-phase reaction mixtures containing organic liquids. *Biotechnol. Adv.* 5, 47–84.
- Hammond, D. a., Karel, M., Klibanov, a. M., Krukonis, V.J., 1985. Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11, 393–400.
- Harada, T., Kubota, Y., Kamitanaka, T., Nakamura, K., Matsuda, T., 2009. A novel method for enzymatic asymmetric reduction of ketones in a supercritical carbon dioxide/water biphasic system. *Tetrahedron Lett.* 50, 4934–4936.
- Hartmann, T., Meyer, H.H., Scheper, T., 2001. The enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-5-phenyl-4-pentenoic acid ethylester in supercritical carbon dioxide using lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 653–660.
- Hernandez, K., Fernandez-Lafuente, R., 2011. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 107–122.
- Hobbs, H.R., Thomas, N.R., 2007. Biocatalysis in supercritical fluids, in fluorinated solvents, and under solvent-free conditions. *Chem. Rev.* 107, 2786–2820.
- Holmes, J.D., Steytler, D.C., Rees, G.D., Robinson, B.H., 1998. Bioconversions in a Water-in-CO<sub>2</sub> Microemulsion. *Langmuir* 14, 6371–6376.
- Holmes, J.D., Ziegler, K.J., Audriani, M., Lee, Bhargava, P. a, Steytler, D.C., Johnston, K.P., 1999. Buffering the Aqueous Phase pH in Water-in-CO<sub>2</sub> Microemulsions. *J. Phys. Chem. B* 103, 5703–5711.

Holwerda, K., Verkade, P., De Willigen, A.H., 1936. Vergleichende Untersuchungen über die Verseifungsgeschwindigkeit einiger Einsäuriger Triglyceride unter Einfluss von Pankreasextrakt. I. Der Einfluss des Verteilungszustandes der Triglyceride auf die Verseifungsgeschwindigkeit. Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas 55, 43–57.

Holzschu, D., Chandler, F., Ajello, L., Ahearn, D., 1979. Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol. 17, 71–78.

Hutt, A.J., Caldwell, J., 1984. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. Clin. Pharmacokinet. 9, 371–3.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu. Rev. Microbiol. 53, 315–51.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu. Rev. Microbiol. 53, 315–351.

Jin, J.N., Lee, S.H., Lee, S.B., 2003. Enzymatic production of enantiopure ketoprofen in a solvent-free two-phase system. J. Mol. Catal. B Enzym. 26, 209–216.

Keurentjes, J.T.F., Voermans, F.J.M., 1997. Membrane separations in the production of optically pure compounds, in: Collins, A., Sheldrake, G.N., Crosby, J. (Eds.), Chirality in Industry II: Developments in the Manufacture and Applications of Opticaly Ctive Compounds. John Wiley & Sons, pp. 157–179.

Kim, M.G., Lee, E.G., Chung, B.H., 2000. Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment. Process Biochem. 35, 977–982.

Kim, S.U., Kim, Y.J., Choi, S.G., Yea, C.H., Singh, R.P., Min, J., Oh, B.K., Choi, J.W., 2008. Direct immobilization of cupredoxin azurin modified by site-directed mutagenesis on gold surface. Ultramicroscopy 108, 1390–1395.

Knez, Ž., 2009. Enzymatic reactions in dense gases. J. Supercrit. Fluids 47, 357–372.

- Knez, Ž., Habulin, M., 2002. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: A short review. *J. Supercrit. Fluids* 23, 29–42.
- Kraai, G.N., Winkelman, J.G.M., de Vries, J.G., Heeres, H.J., 2008. Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. *Biochem. Eng. J.* 41, 87–94.
- Lau, S.Y., Uzir, M.H., Kamaruddin, A.H., Bhatia, S., 2010. Lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of racemic ibuprofen ester via hollow fiber membrane reactor: Modeling and simulation. *J. Memb. Sci.* 357, 109–121.
- Lee, E.G., Won, H.S., Ro, H.S., Ryu, Y.W., Chung, B.H., 2003. Preparation of enantiomerically pure (*S*)-flurbiprofen by an esterase from *Pseudomonas* sp. KCTC 10122BP. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 26, 149–156.
- Lee, K.W., Bae, H.A., Shin, G.S., Lee, Y.H., 2006. Purification and catalytic properties of novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* sp. ES-1 for hydrolysis of (*S*)-ketoprofen ethyl ester. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 443–448.
- Lee, W.H., Kim, K.-J., Kim, M.G., Lee, S.B., 1995. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: Effects of organic cosolvents and temperature. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 613–615.
- Lianghua, T., Liming, X., Min, S., Huaying, G., 2007. Purification and application of a lipase from *Penicillium expansum* PED-03. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142, 194–199.
- Lin, G.-Q., You, Q.-D., Cheng, J.-F., 2011. Overview of chirality and chiral drugs, in: Lin, G.-Q., You, Q.-D., Cheng, J.-F. (Eds.), *Chiral Drugs*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, pp. 3–28.
- Liu, K.J., Huang, Y.R., 2010. Lipase-catalyzed production of a bioactive terpene ester in supercritical carbon dioxide. *J. Biotechnol.* 146, 215–220.
- Liu, Y., Guo, C., Sun, X.T., Liu, C.Z., 2013. Improved performance of *Yarrowia lipolytica* lipase-catalyzed kinetic resolution of (*R,S*)-2-octanol by an integrated strategy of interfacial activation, bioimprinting and immobilization. *Bioresour. Technol.* 142, 415–419.

- Liu, Y.Y., Xu, J.H., Wu, H.Y., Shen, D., 2004. Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen. *J. Biotechnol.* 110, 209–217.
- Long, W.S., Kow, P.C., Kamaruddin, A.H., Bhatia, S., 2005. Comparison of kinetic resolution between two racemic ibuprofen esters in an enzymic membrane reactor. *Process Biochem.* 40, 2417–2425.
- Long, Z., Xu, J., Zhao, L., Pan, J., Yang, S., Hua, L., 2007. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen 47, 105–110.
- López, N., Pernas, M. a., Pastrana, L.M., Sánchez, A., Valero, F., Rúa, M.L., 2004. Reactivity of Pure *Candida rugosa* Lipase Isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in Aqueous and Organic Media. Influence of the Isoenzymatic Profile on the Lipase Performance in Organic Media. *Biotechnol. Prog.* 20, 65–73.
- Lozano, P., De Diego, T., Sauer, T., Vaultier, M., Gmouh, S., Iborra, J.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. *J. Supercrit. Fluids* 40, 93–100.
- Lozano, P., Vllora, G., Gómez, D., Gayo, a. B., Sánchez-Conesa, J. a., Rubio, M., Iborra, J.L., 2004. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 29, 121–128.
- Macnaughton, S.J., Kikic, I., Foster, N.R., Alessi, P., Cortesi, A., Chimica, I., Prime, M., 1996. Solubility of Anti-Inflammatory Drugs in Supercritical Carbon Dioxide 9568, 1083–1086.
- Madzak, C., Gaillardin, C., Beckerich, J.M., 2004. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. *J. Biotechnol.* 109, 63–81.
- Manetti, F., Mileto, D., Corelli, F., Soro, S., Palocci, C., Cernia, E., D'Acquarica, I., Lotti, M., Alberghina, L., Botta, M., 2000. Design and realization of a tailor-made enzyme to modify the

molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1543, 146–158.

Margolin, A.L., 1993. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 266–280.

Marszałł, M.P., Siódmiak, T., 2012. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto magnetic beads for kinetic resolution of (*R,S*)-ibuprofen. *Catal. Commun.* 24, 80–84.

Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K., 1995. *Biophysica BB* On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as 1258, 272–276.

Marty, A, Chulalaksananukul, W., Willemot, R.M., Condoret, J.S., 1992. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO<sub>2</sub>. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 273–280.

Marty, A., Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Willemot, R.M., Durand, G., 1990. Comparison of lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane. *Biotechnol. Lett.* 12, 11–16.

Marty, A., Condoret, J.S., 2001. Enzymatic Transformations in Supercritical Fluids, in: Vulfson, E.N., Halling, P.J., Holland, H.L. (Eds.), *Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*. Springer Science & Business Media, pp. 587–602.

Maruyama, T., Nakajima, M., Uchikawa, S., Nabetani, H., Furusaki, S., Seki, M., 2000. Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 1121–1127.

Matsuda, T., 2013. Recent progress in biocatalysis using supercritical carbon dioxide. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 233–241.

Matsuda, T., Harada, T., Nakamura, K., Ikariya, T., 2005. Asymmetric synthesis using hydrolytic enzymes in supercritical carbon dioxide. *Tetrahedron Asymmetry* 16, 909–915.

Matsuda, T., Kanamaru, R., Watanabe, K., Kamitanaka, T., Harada, T., Nakamura, K., 2003. Control of enantioselectivity of lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide by tuning the pressure and temperature. *Tetrahedron Asymmetry* 14, 2087–2091.

- Matsuda, T., Watanabe, K., Harada, T., Nakamura, K., 2004. Enzymatic reactions in supercritical CO<sub>2</sub>: Carboxylation, asymmetric reduction and esterification. *Catal. Today* 96, 103–111.
- Michor, H., Marr, R., Gamse, T., 1996. Enzymatic catalysis in supercritical carbon dioxide: effect of water activity. *High Press. Chem. Eng.* 115–120.
- Mittal, S., Khanna, S., Roy, A., Bharatam, P. V., Chawla, H.P.S., 2005. *Candida rugosa* lipase mediated multigram synthesis of acid part of *S(+)*-atliprofen, a new NSAID and molecular modeling studies aimed at predicting selectivity of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 232–238.
- Mohammadi, M., Gandomkar, S., Habibi, Z., Yousefi, M., 2016. One pot three-component reaction for covalent immobilization of enzymes: application of immobilized lipases for kinetic resolution of rac-ibuprofen. *RSC Adv.* 6, 52838–52849.
- Moriyoshi, T., Kita, T., Uosaki, Y., 1993. Static relative permittivity of carbon dioxide and nitrous oxide up to 30 MPa. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 97, 589.
- Nakaya, H., Miyawaki, O., Nakamura, K., 2001. Determination of log P for pressurized carbon dioxide and its characterization as a medium for enzyme reaction. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 176–182.
- Ng, I.S., Tsai, S.W., 2006. Investigation of lipases from various *Carica papaya* varieties for hydrolysis of olive oil and kinetic resolution of (*R,S*)-profen 2,2,2-trifluoroethyl thioesters. *Process Biochem.* 41, 540–546.
- Nicaud, J.M., Madzak, C., van den Broek, P., Gysler, C., Duboc, P., Niederberger, P., Gaillardin, C., 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 2, 371–379.
- Nioi, C., Riboul, D., Destrac, P., Marty, a., Marchal, L., Condoret, J.S., 2015. The centrifugal partition reactor, a novel intensified continuous reactor for liquid-liquid enzymatic reactions. *Biochem. Eng. J.* 103, 227–233.

- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A., 1992. The alpha / beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, 197–211.
- Olsen, T., Kerton, F., Marriott, R., Grogan, G., 2006. Biocatalytic esterification of lavandulol in supercritical carbon dioxide using acetic acid as the acyl donor. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 621–625.
- Ong, a. L., Kamaruddin, a. H., Bhatia, S., Long, W.S., Lim, S.T., Kumari, R., 2006. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (*R*)-ketoprofen. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 924–929.
- Overbeeke, P.L. a, Jongejan, J. a., 2003. Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in the hydrolysis of 2-chloropropionic acid methyl ester. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 21, 89–91.
- Paiva, A., Vidinha, P., Angelova, M., Rebocho, S., Barreiros, S., Brunner, G., 2011. Biocatalytic separation of (*R*, *S*)-1-phenylethanol enantiomers and fractionation of reaction products with supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 55, 963–970.
- Palocci, C., Falconi, M., Chronopoulou, L., Cernia, E., 2008. Lipase-catalyzed regioselective acylation of tritylglycosides in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 45, 88–93.
- Peters, I., Nelson, F., 1948a. Factors Influencing the Production of. *J. Bacteriol.* 15, 5–9.
- Peters, I., Nelson, F., 1948b. Preliminary Characterization of the Lipase of *mycotorula lipolytica*. *Dairy Ind. Sect.* 593–600.
- Piamtongkam, R., Duquesne, S., Bordes, F., Barbe, S., André, I., Marty, A., Chulalaksananukul, W., 2011. Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipases (Lip1, Lip3, and Lip4) towards 2-bromo phenylacetic acid octyl esters controlled by a single amino acid. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1749–1756.
- Pieterse, W. a, Vidal, J.C., Volwerk, J.J., de Haas, G.H., 1974. Zymogen-catalyzed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces in phospholipase A2. *Biochemistry* 13, 1455–60.

- Pignède, G., Wang, H., Fudalej, F., Seman, M., Nicaud, J., Gaillardin, C., Pigne, G., 2000. Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica* 182, 2802–2810.
- Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C., Schmid, R.D., 2000. Lipase engineering database. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10, 491–508.
- Qin, B., Liang, P., Jia, X., Zhang, X., Mu, M., Wang, X.Y., Ma, G.Z., Jin, D.N., You, S., 2013. Directed evolution of *Candida antarctica* lipase B for kinetic resolution of profen esters. *Catal. Commun.* 38, 1–5.
- R. Schaad, D., 1999. Industrial Applications of chiral auxiliaries, Ager D.J., . ed, Handbook of chiral chemicals.
- Randolph, T.W., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., Wilke, C.R., 1985. Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.* 7, 325–328.
- Rantakyla, M., Aaltonen, O., 1994. Enantioselective esterification of ibuprofen in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase. *Biotechnol. Lett.* 16, 825–830.
- Reis, P., Watzke, H., Leser, M., Holmberg, K., Miller, R., 2010. Interfacial mechanism of lipolysis as self-regulated process. *Biophys. Chem.* 147, 93–103.
- Rezaei, K., Temelli, F., 2001. On-line extraction-reaction of canola oil using immobilized lipase in supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 19, 263–274.
- Rezaei, K., Temelli, F., Jenab, E., 2007. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. *Biotechnol. Adv.* 25, 272–280.
- Rivera, I., Mateos, J.C., Marty, A., Sandoval, G., Duquesne, S., 2013. Lipase from *Carica papaya* latex presents high enantioselectivity toward the resolution of prodrug (*R,S*)-2-bromophenylacetic acid octyl ester. *Tetrahedron Lett.* 54, 5523–5526.
- Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C., Habulin, M., Primožic, M., Knez, Z., 2005. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 33, 77–84.



- Roosen, C., Ansorge-Schumacher, M., Mang, T., Leitner, W., Greiner, L., 2007. Gaining pH-control in water/carbon dioxide biphasic systems. *Green Chem.* 9, 455–458.
- Saktaweewong, S., Phinyocheep, P., Ulmer, C., Marie, E., Durand, A., Inprakhon, P., 2011. Lipase activity in biphasic media: Why interfacial area is a significant parameter? *J. Mol. Catal. B Enzym.* 70, 8–16.
- Salgin, U., Salgin, S., Takaç, S., 2007. The enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester in supercritical CO<sub>2</sub> using *Candida rugosa* lipase. *J. Supercrit. Fluids* 43, 310–316.
- Salis, A., Sanjust, E., Solinas, V., Monduzzi, M., 2003. Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 24-25, 75–82.
- Samvura, J.C., Totté, A., 2006. Utilisation du CO<sub>2</sub> supercritique dans le domaine agro-alimentaire Introduction Fluide supercritique GAZ Fluide supercritique Liquide Densité Viscosité Diffusivité Quelques fluides supercritiques Solvant Masse Température critique (° C) Pression critiqu. *Newsletter du Pôle Technol. Agro-alimentaire asbl* 32, 1–5.
- Sandoval, G., Marty, A., 2007. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 390–393.
- Sarda, L., Desnuelle, P., 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 30, 513–521.
- Schonheyder, F., Volqvartz, K., 1945. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. *Acta Physiol.* 9, 57–67.
- Schrag, J.D., Cygler, M., 1997. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol.* 284, 85–107.
- Scillipoti, J., Nioi, C., Marty, A., Camy, S., Condoret, J.-S., 2016. Prediction of conversion at equilibrium for lipase esterification in two-phase systems. *Biochem. Eng. J.*
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627–662.

- Shekarchizadeh, H., Kadivar, M., 2012. A study on parameters of potential cocoa butter analogue synthesis from camel hump by lipase-catalysed interesterification in supercritical CO<sub>2</sub> using response surface methodology. *Food Chem.* 135, 155–160.
- Sheldon, R.A., 1993. *Chirotechnology, industrial synthesis of optically active compounds.*
- Silveira, R.L., Martinez, J., Skaf, M.S., Martinez, L., 2012. Enzyme microheterogeneous hydration and stabilization in supercritical carbon dioxide. *J. Phys. Chem. B* 116, 5671–5678.
- Simons, J.R., Mosisch, M., Torda, a. E., Hilterhaus, L., 2013. Site directed immobilization of glucose-6-phosphate dehydrogenase via thiol-disulfide interchange: Influence on catalytic activity of cysteines introduced at different positions. *J. Biotechnol.* 167, 1–7.
- Siódmiak, T., Ziegler-Borowska, M., Marszał, M.P., 2013. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (*R,S*)-ibuprofen. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 94, 7–14.
- Sovová, H., Zarevúcka, M., 2003. Lipase-catalysed hydrolysis of blackcurrant oil in supercritical carbon dioxide. *Chem. Eng. Sci.* 58, 2339–2350.
- Steenkamp, L., Brady, D., 2008. Optimisation of stabilised Carboxylesterase NP for enantioselective hydrolysis of naproxen methyl ester. *Process Biochem.* 43, 1419–1426.
- Steenkamp, L., Brady, D., 2003. Screening of commercial enzymes for the enantioselective hydrolysis of *R,S*-naproxen ester. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 472–477.
- Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C., Deng, L., 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochem.* 39, 459–465.
- Thirstrup, K., Verger, R., Carrière, F., 1994. Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochemistry* 33, 2748–2756.
- Torres, R., Ortiz, C., Pessela, B.C.C., Palomo, J.M., Mateo, C., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2006. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 167–171.

- Tsai, S.W., Huang, C.M., 1999. Enantioselective synthesis of (*S*)-suprofen ester prodrugs by lipase in cyclohexane. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 682–688.
- Tsai, S.-W., Wei, H.-J., 1994. Kinetics of Enantioselective Esterification of Naproxen by Lipase in Organic Solvents. *Biocatal. Biotransformation* 11, 33–45.
- Van den Berg, B., Tessari, M., Boelens, R., Dijkman, R., De Haas, G.H., Kaptein, R., Verheuj, H.M., 1995. NMR structures of phospholipase A2 reveal conformational changes during interfacial activation. *Nature* 2, 983–989.
- Van der Walt, J.P., von Arx, J. a, 1980. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46, 517–521.
- Weiser, D., Varga, A., Kovács, K., Nagy, F., Szilágyi, A., Vértessy, B.G., Paizs, C., Poppe, L., 2014. Bisepoxide cross-linked enzyme aggregates - New immobilized biocatalysts for selective biotransformations. *ChemCatChem* 6, 1463–1469.
- Wen, S., Tan, T., Zhao, H., 2012. Improving the thermostability of lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* 164, 248–253.
- Wickerham, L.J., Kurtzman, C.P., Herman, a I., 1970. Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* 167, 1141.
- Wiebe, R., Gaddy, V.L., 1941. Vapor Phase Composition of carbon dioxide-water mixtures at various temperatures and at pressures to 700 atmospheres 63, 475–477.
- Williams, K., Day, R., Knihinicki, R., Duffield, A., 1986. The stereoselective uptake of ibuprofen enantiomers into adipose tissue. *Biochem. Pharmacol.* 35, 3403–3405.
- Winkler, F., D’Arcy, A., Hunziker, W., 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343, 771–774.
- Won, K., Hong, J.K., Kim, K.J., Moon, S.J., 2006. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic ibuprofen coupled with pervaporation. *Process Biochem.* 41, 264–269.

- Wood, W.M., 1997. Crystal science in manufacture of chiral compounds, in: Collins, A., Sheldrake, G., Crosby, J. (Eds.), In Chirality in Industry II: Developments in the Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds. pp. 118–156.
- Wright, H.B., Moore, M.B., 1948. Reactions of aralkyl amines with carbon dioxide. J. Am. Chem. Soc. 70, 3865.
- Wu, J.Y., Liu, S.W., 2000. Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: Under controlled water activity. Enzyme Microb. Technol. 26, 124–130.
- Xi, W.W., Xu, J.H., 2005. Preparation of enantiopure (*S*)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. Process Biochem. 40, 2161–2166.
- Xin, J.Y., Li, S. Ben, Chen, X.H., Wang, L.L., Xu, Y., 2000. Improvement of the enantioselectivity of lipase-catalyzed naproxen ester hydrolysis in organic solvent. Enzyme Microb. Technol. 26, 137–141.
- Xin, J.Y., Li, S. Ben, Xu, Y., Chui, J.R., Xia, C.G., 2001. Dynamic enzymatic resolution of Naproxen methyl ester in a membrane bioreactor. J. Chem. Technol. Biotechnol. 76, 579–585.
- Xin, J.Y., Zhao, Y.J., Shi, Y.G., Xia, C.G., Li, S. Ben, 2005. Lipase-catalyzed naproxen methyl ester hydrolysis in water-saturated ionic liquid: Significantly enhanced enantioselectivity and stability. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 193–199.
- Xu, L., Jiang, X., Yang, J., Liu, Y., Yan, Y., 2010. Cloning of a novel lipase gene, lipJ08, from *Candida rugosa* and expression in *Pichia pastoris* by codon optimization. Biotechnol. Lett. 32, 269–276.
- Yan, Y., Zhang, X., Chen, D., 2013. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids. Bioresour. Technol. 131, 179–187.
- Yarrow, D., 1972. Four new combinations in yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek 38, 357–360.

- Yilmaz, E., Can, K., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2011a. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester. *Bioresour. Technol.* 102, 499–506.
- Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2011b. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (*R,S*)-Naproxen methyl ester. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 69, 35–41.
- Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2010. Enantioselective hydrolysis of rasemic naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 62, 162–168.
- Yon, L.S., Gonawan, F.N., Kamaruddin, A.H., Uzir, M.H., 2013. Enzymatic Deracemization of (*R, S*) Ibuprofen Ester via Lipase- catalyzed Membrane Reactor.
- Yousefi, M., Mohammadi, M., Habibi, Z., 2014a. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 104, 87–94.
- Yousefi, M., Mohammadi, M., Habibi, Z., 2014b. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 104, 87–94.
- Yu, M., Lange, S., Richter, S., Tan, T., Schmid, R.D., 2007. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* 53, 255–263.
- Zhang, Y.Y., Liu, J.H., 2011. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (*R, S*)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochem. Eng. J.* 54, 40–46.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., 2005. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on a pH-sensitive support for enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J. Biotechnol.* 117, 397–401.
- Ziegler, K.J., Hanrahan, J.P., Glennon, J.D., Holmes, J.D., 2003. Producing “pH switches” in biphasic water-CO<sub>2</sub> systems. *J. Supercrit. Fluids* 27, 109–117.
- Zinjarde, S.S., 2014. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem.* 152, 1–10.