

La lipase de *Candida rugosa* : caractérisation biochimique

Biochemical characterization of *Candida rugosa* lipase

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 9, Numéro 1, 49-53, Janvier - Février 2002, Fondamental

Auteur(s) : Hounaida MTIBAA, Ahmed FENDRI, Adel SAYARI, Abderraouf BEN SALAH, Hafedh MEJDOUB, Youssef GARGOURI, Unité de lipolyse enzymatique, ENIS, BPW 3038, Sfax, Tunisie.

Résumé : Les lipases ou triacylglycérols hydrolases (EC 3.1.1.3) sont des enzymes qui agissent en milieu hétérogène. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons esters des triacylglycérols à l'interface huile/eau [1]. Leur particularité vient du fait que ces enzymes sont plus actives sur les lipides qui sont sous forme agrégée [2]. Les lipases sont présentes dans la plupart des tissus animaux et végétaux ainsi que chez les microorganismes qui constituent une source importante de production de lipases à grande échelle. À ce jour, de nombreuses lipases de microorganismes ont été purifiées et caractérisées et certaines d'entre elles ont été cristallisées (lipase de *Pseudomonas glumae* [3], lipase de *Rhizomucor miehei* [4], lipase *Geotrichum candidum* [5], lipase de *Candida rugosa* [6]...). La lipase de *Candida cylindracea* (qui est l'ancien nom de *Candida rugosa*) a été cristallisée en présence et en l'absence d'inhibiteurs [7]. Il s'agit d'une alpha/beta hydrolase comprenant 11 brins beta entourés par 8 hélices alpha [6]. La triade catalytique est cachée sous un flap constitué de 26 résidus d'acides aminés. Dans le présent travail, nous avons cherché à étudier quelques caractéristiques biochimiques de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) qui a été purifiée dans notre laboratoire à partir de la poudre commercialisée.

Summary : *Candida rugosa* lipase (CRL) was purified to homogeneity from crude powder. CRL hydrolyses triacylglycerols without chain length specificity. A specific activity of about 800 U/mg was measured with triolein or tributyrin as substrate at 37°C and pH 8. CRL is a true lipase. This enzyme presents the interfacial activation phenomenon when tripropionin was used as substrate. Contrary to many lipases, CRL is able to hydrolyse its substrate in the presence of natural detergents. Synthetic detergents act as potent inhibitors of CRL activity. This effect disappears when bile salt is added to the lipolysis system. The covalent modification of CRL with tetrahydrolipstatine (THL) inactivates the enzyme. This result confirms that CRL is a serine enzyme like all lipases from various origins.

Keywords : lipase, interfacial activation, amphiphiles, inhibition, reactivation.

ARTICLE

Matériel et méthodes

Réactifs

La benzamidine et la tributyrine (99 % de pureté) sont de Fluka ; la tripropionine (97 % de pureté) est de Janssen Chimica (Belgique) ; le désoxycholate de sodium (NaDC), le taurodésoxycholate de sodium (NaTDC), le triton X-100 et la triacétine (99 % de pureté) sont de Sigma Chemical (St. Louis, États-Unis) ; la gomme arabique est de Mayaud Baker Ltd (Dagenham, Royaume-Uni) ; l'acrylamide et tous les réactifs utilisés pour l'électrophorèse sont de Bio-Rad (Paris, France) ; la tétrahydrolipstatine (THL) est gracieusement fournie par le Pr A.E. Fischli (F. Hoffman La Roche, Suisse) les marqueurs de protéines et supports chromatographiques - Séphacryl S-200, Séphadex G-100, Mono Q-Sépharose et Superose-12 - sont de Pharmacia (Uppsala, Suède).

Enzymes et protéines

La sérum albumine bovine (BSA) ($\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%} = 6,7$) est de Sigma Chemical (St. Louis, États-Unis) ; la poudre commerciale de la lipase de *Candida rugosa* est de Sigma Chemical Company (États-Unis) ; la lipase de *Candida rugosa* a été purifiée à homogénéité selon Louisa Rua *et al.* [8] ; la lipase de *Rhizopus oryzae* (ROL) a été purifiée selon Ben Sala *et al.* [9].

Dosage de l'activité lipasique

L'activité lipasique est mesurée par titration des acides gras libres avec du NaOH 100 mM à pH 8 et à 37 °C à l'aide d'un pH-stat (Metrohm, Suisse) en utilisant une émulsion d'huile d'olive [10] ou la tributyrine (TC₄) [11] comme substrat. Quelques essais ont été effectués en présence de désoxycholate de sodium (NaDC), taurodésoxycholate de sodium (NaTDC) ou triton X-100 (TX-100).

L'activité lipasique a aussi été mesurée, à pH 7 et à 37 °C en utilisant la tripropionine (TC₃) comme substrat, selon la méthode décrite par Ferrato *et al.* [12].

Une unité lipase correspond à la libération de 1 μmol d'acide gras par min. L'activité spécifique est exprimée en unités par mg d'enzyme. Des essais de modifications covalentes ont été menés en présence de tétrahydrolipstatine (THL) (excès molaire THL/enzyme = 100), en l'absence [13, 14] ou en présence de 4 mM NaDC [13, 14]. L'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée sur une émulsion d'huile d'olive à pH 8 et 37 °C.

Détermination de la concentration en protéines

La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode spectrophotométrique décrite par Bradford [15] en utilisant la sérum albumine bovine (BSA) comme étalon.

Méthodes analytiques

L'analyse des protéines par électrophorèse, sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE), a été effectuée selon la méthode de Laemmli [16].

Activation interfaciale

Pour mettre en évidence le phénomène d'activation interfaciale, nous avons utilisé la tripropionine (TC_3) comme substrat [12]. Des solutions de concentrations croissantes en TC_3 ont été préparées dans la gomme arabique (GA) 0,33 %, NaCl 0,15 M. La libération de l'acide propionique est suivie continuellement à pH 7 et à 37 °C à l'aide d'un pH-stat. La concentration micellaire critique (CMC) de la TC_3 est 12 mM.

Résultats et discussion

Purification de la CRL, spécificité de substrat

La lipase CRL a été purifiée selon un protocole adapté de Louisa Rua *et al.* [8]. L'enzyme pur a été obtenu après une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, une filtration sur séphadex G-100, une chromatographie échangeuse d'anions (Mono-Q sépharose) suivie d'une deuxième filtration sur supérose-12.

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (13 %), dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de la CRL, issue de la deuxième filtration sur supérose-12, montre que la protéine est pure présentant une masse moléculaire de 60 kDa (*figure 1*).

La CRL ne présente pas de spécificité apparente vis-à-vis de la longueur de la chaîne des acides gras des triacylglycérols. Des activités spécifiques de 840 et 700 U/mg ont été obtenues en utilisant, respectivement, une émulsion d'huile d'olive ou la TC_4 comme substrat.

Activation interfaciale de la CRL

Sarda et Desnuelle [2] ont montré que la différence entre une estérase et une lipase pancréatique est fondée sur la capacité ou l'incapacité de l'enzyme à s'adsorber aux interfaces. La TC_3 est considérée comme étant le meilleur système, parmi les triacylglycérols à chaînes courtes, pour mettre en évidence le phénomène d'activation interfaciale [12].

Pour étudier ce phénomène, nous avons mesuré l'activité de la CRL (*figure 2*) en fonction de concentrations croissantes de TC_3 émulsifiée dans la GA à 0,33 % en présence de 0,15 M de NaCl.

La *figure 2* montre que l'activité de la CRL est faible pour des concentrations de TC_3 inférieures à la CMC. En revanche, l'activité enzymatique augmente brusquement au-delà de la limite de solubilité de TC_3 . Ce résultat indique que la CRL, comme d'autres lipases, telle que la lipase de *Rhizopus oryzae* [17], présente le phénomène d'activation interfaciale.

Récemment, Ferrato *et al.* [12] ont redéfini les lipases comme étant une famille d'enzymes capables d'hydrolyser des triacylglycérols à chaînes longues indépendamment de la présence ou l'absence du phénomène d'activation interfaciale. Si l'on se fonde sur cette nouvelle définition, on peut dire que la CRL, qui hydrolyse efficacement l'huile d'olive, est une vraie lipase.

Effet des détergents naturels (NaDC et NaTDC) sur l'activité de la CRL

Dans le but de tester le pouvoir de pénétration de la CRL, nous avons mesuré l'activité lipasique en présence de composés amphipathiques tels que les sels biliaires (SB) ou certains détergents de synthèse qui sont connus pour être de puissants inhibiteurs des lipases de différentes origines [18, 19].

L'activité de la CRL purifiée a été mesurée sur une émulsion d'huile d'olive en présence de concentrations croissantes de SB : NaDC (*figure 3A*) et NaTDC (*figure 3B*). Pour plus de comparaison, nous avons porté sur la même figure les résultats obtenus, dans les mêmes conditions, avec la ROL.

La *figure 3* montre que, contrairement à la ROL, les SB n'ont aucun effet inhibiteur sur l'activité de la CRL, même à des concentrations élevées. Ce résultat montre que la CRL possède un pouvoir de pénétration lui permettant d'accéder aux interfaces lipide/eau même en présence de fortes concentrations de SB. Il a été montré que toute molécule amphipatique ayant un pouvoir de pénétration plus élevé que celui de l'enzyme, agit comme inhibiteur [20, 21]. On peut alors dire que la CRL est plus pénétrante que la ROL. Cette propriété permet d'envisager l'utilisation de la CRL dans des applications biotechnologiques.

Effet d'un détergent synthétique non ionique (triton X-100) sur l'activité de la CRL

On a voulu tester d'autres détergents plus tensioactifs que les sels biliaires [18]. Pour cela on a mesuré, sur une émulsion d'huile d'olive, l'effet de concentrations croissantes de triton X-100 sur l'activité de la CRL. La *figure 4A* montre que, contrairement à ce qui a été observé avec les SB, le triton X-100 se comporte comme inhibiteur de l'activité enzymatique de la CRL. L'addition de concentrations croissantes de NaDC dans le système de lipolyse, contenant la CRL et une concentration inhibitrice de triton X-100 (0,6 mM) (*Figure 4A*), entraîne la réactivation de la lipase. Cette réactivation est probablement liée à la formation de micelles mixtes (SB/Triton X-100) moins tensioactifs que les micelles de triton X-100 pure [18]. Ces micelles mixtes sont tolérées par la CRL.

Modification covalente de la CRL par la THL

Pour confirmer que la CRL est un enzyme à sérine, nous avons étudié l'effet de la THL (réactif à sérine) sur l'activité de l'enzyme. L'incubation de l'enzyme en présence de THL (rapport molaire THL/lipase = 100) a été effectuée à pH 8 en absence ou en présence de 4 mM NaDC (*figure 5*).

La *figure 5* montre que la CRL perd 70 % de son activité après 120 min d'incubation avec THL. L'inhibition est liée à la fixation covalente de la THL sur la sérine catalytique. L'addition de NaDC, dans le milieu d'incubation, accélère d'une manière significative l'effet inhibiteur de la THL sur la CRL (100 % d'inhibition après 120 min).

Les micelles mixtes THL-NaDC favorisent probablement l'interaction lipase-THL, ce qui accélère l'inhibition. Ce phénomène a été décrit dans le cas de l'inhibition de la lipase pancréatique avec le diéthyl p-nitrophényl phosphate (E₆₀₀) [22, 23].

Nos résultats confirment que la CRL, comme toutes les lipases déjà décrites [14], est une enzyme à sérine.

CONCLUSION

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet CMCU (00F0902) et d'un projet PNM-DGRST (99/UR/09-19).

REFERENCES

1. VERGER R, de HAAS GH (1973). Enzyme reactions in a membrane model. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem Phys Lipids*, 10 : 127-36.
2. SARDA L, DESNUELLE P (1958). Action of pancreatic lipase on emulsified esters. *Biochim Biophys Acta*, 30 : 513-21.
3. NOBLE NEM, CLEASBY A, JOHNSON LN, EGMOND MR, FRENKEN LGJ (1993). The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett*, 331 : 121-8.
4. BRADY L, BRZOZOWSKI AM, DEREWENDA ZS, *et al.* (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 343 : 767-70.
5. SCHRAG JD, LI Y, WU S, CYGLER M (1991). Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351 : 761-4.
6. GROCHULSKI P, LI Y, SCHRAG JD, *et al.* (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem*, 268 : 12843-7.
7. GHOSH D, WAWRSAK Z, PLETNEV VZ, *et al.* (1995). Structure of uncomplexed and linoleate-bound *Candida cylindracea* cholesterol esterase. *Structure*, 3 : 279-88.
8. LOUISA RUA M, DIAZ-MAURINO T, FERNANDEZ VM, OTERO C, BALLESTEROS A (1993). Purification and characterisation of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta*, 1156 : 181-9.
9. BEN SALAH A, FENDRI K, GARGOURI Y (1994). La lipase de *Rhizopus oryzae* : production, purification et caractéristiques biochimiques. *Rev Française des Corps Gras*, 41 : 133-7.
10. RATHELOT J, JULIEN R, CANIONI P, COEROLI C, SARDA L (1975). Studies on the effect of bile salt and colipase on enzymatic lipolysis. Improved method for the determination of pancreatic lipase and colipase. *Biochimie*, 57 : 1117-22.
11. GARGOURI Y, CUDREY C, MEJBOUB H, VERGER R (1992). Inactivation of human pancreatic lipase by 5-dodecylthio-2-nitrobenzoic acid. *Eur J Biochem*, 204 : 1063-7.
12. FERRATO F, CARRIERE F, SARDA L, VERGER R (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods in Enzymol*, 286 : 327-46.

13. GARGOURI Y, CHAHINIAN H, MOREAU H, RANSAC S, VERGER R (1991). Inactivation of pancreatic lipases by THL and C12:0-TNB: a kinetic study with emulsified tributyrin. *Biochem Biophys Acta*, 1085 : 322-8.
14. GARGOURI Y, RANSAC S, VERGER R (1997). Covalent inhibition of digestive lipases. An *in vitro* study. *Biochim Biophys Acta*, 1344 : 6-37.
15. BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 : 248-54.
16. LAEMMLI UK (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-5.
17. BEN SALAH A, SAYARI A, VERGER A, GARGOURI Y (2001). Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique. *Biochimie*, 83 (in press).
18. GARGOURI Y, JULIEN R, BOIS AG, VERGER R, SARDA L (1983). Studies on the detergent inhibition of pancreatic lipase activity. *J Lip Res*, 24 : 1336-42.
19. PIERONI G, GARGOURI Y, SARDA L, VERGER R (1990). Interactions of lipases with lipid monolayers. Facts and questions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 32 : 341-78.
20. GARGOURI Y, PIERONI G, RIVIERE C, SARDA L, VERGER R (1986). Inhibition of lipases by proteins: a binding study using dicaprin monolayers. *Biochemistry*, 24 : 1733-8.
21. GARGOURI Y, PIERONI G, SUGIHARA L, SARDA L, VERGER R (1985). Inhibition of lipases by proteins: a kinetic study with dicaprin monolayers. *J Biol Chem*, 260 : 2268-73.
22. ROUARD M, SARI H, NURIT S, ENTRESSANGLES B, DESNUELLE P (1978). Inhibition of pancreatic lipase by mixed micelles of diethyl-p-nitrophenyl phosphate and bile salts. *Biochem Biophys Acta*, 530 : 227-35.
23. MOREAU H, MOULIN A, GARGOURI Y, NOEL JP, VERGER R (1991). Inactivation of gastric and pancreatic lipases by diethyl p-nitrophenyl phosphate. *Biochemistry*, 30 : 1037-41.

Illustrations

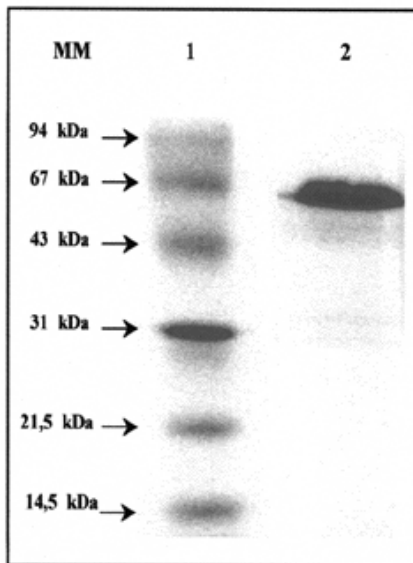


Figure 1. SDS-PAGE (13 %). 1 : 10 μ g d'une gamme étalon de différentes masses moléculaires (Pharmacia) ; 2 : 10 μ g de la CRL purifiée (sortie de la Superose-12). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

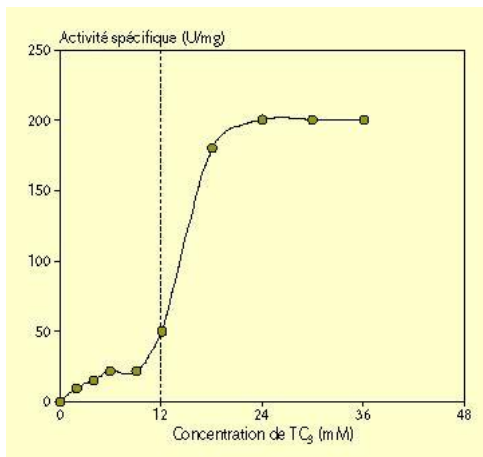


Figure 2. Vitesse d'hydrolyse de la TC₃ par la CRL, en fonction de la concentration de substrat. Les solutions de TC₃ émulsifiées ont été préparées en faisant homogénéiser (3 x 30 s, à l'aide d'un mixer) différents volumes de TC₃ dans 30 ml de GA 0,33 % en présence de 0,15 M NaCl. La libération de l'acide propionique a été suivie continuellement, à pH 7 et à 37 °C, en utilisant un pH-stat. La CMC de la TC₃ (12 mM) est indiquée en pointillés.

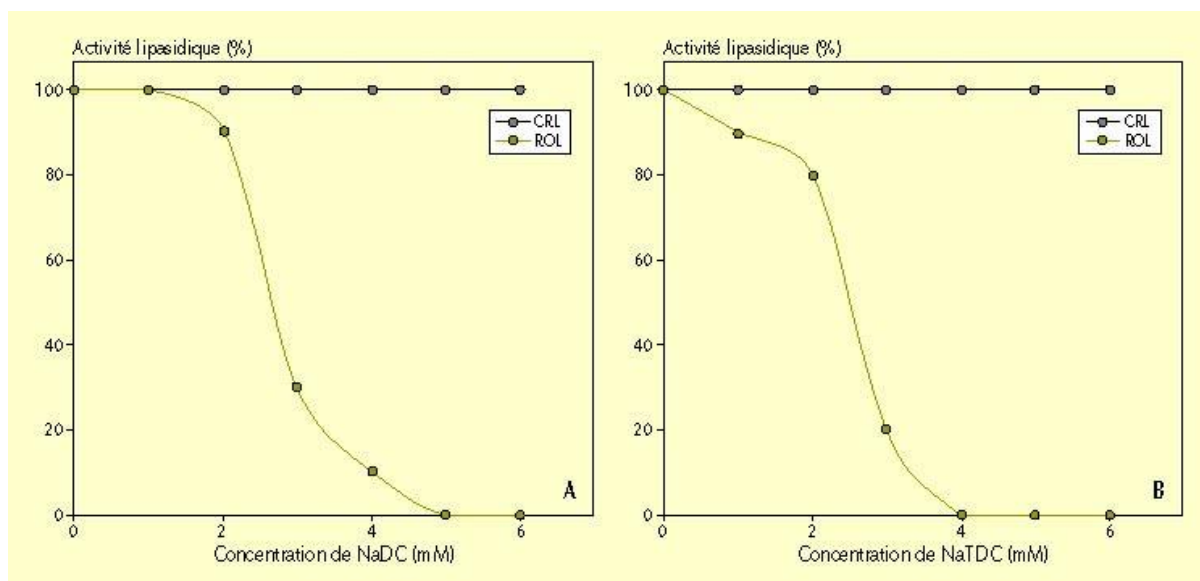


Figure 3. Effet de NaDC (A) ou NaTDC (B) sur le taux d'hydrolyse d'une émulsion d'huile d'olive par la CRL (•) ou par la ROL (•). L'activité lipolytique a été mesurée à pH 8 et à 37 °C à l'aide d'un pH-stat.

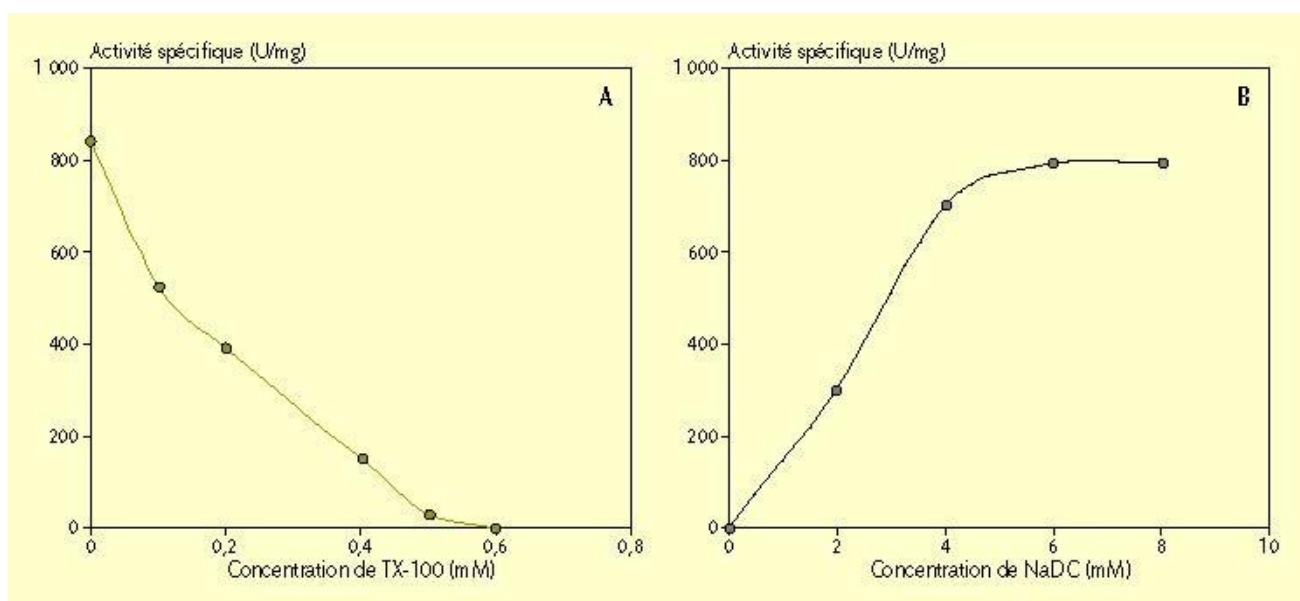


Figure 4. (A) Effet de TX-100 sur le taux d'hydrolyse d'une émulsion d'huile d'olive par la CRL ; (B) Réactivation de la CRL, inhibée par le TX-100 (0,6 mM), par addition de concentrations croissantes de NaDC dans le milieu de lipolyse. L'activité lipolytique a été mesurée à pH 8 et à 37 °C à l'aide d'un pH-stat.

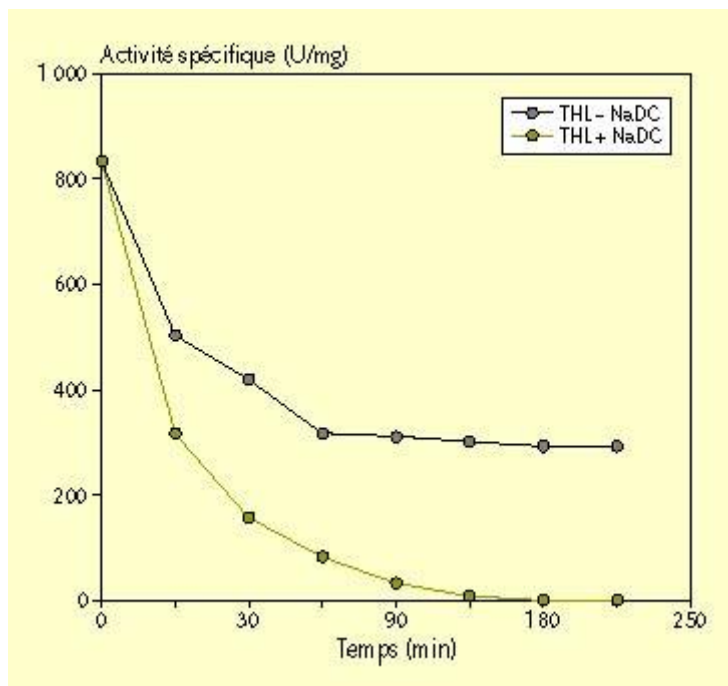


Figure 5. *Modification covalente de la CRL par la THL en absence (●) et en présence (◻) de 4 mM NaDC. L'enzyme a été incubée à 37 °C en présence de THL (excès molaire de 100). L'activité lipolytique résiduelle a été mesurée à pH 8 et à 37 °C à l'aide d'un pH-stat.*