

Libération des acides gras par autolyse enzymatique des triglycérides des graines oléoprotéagineuses

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 8, Numéro 1, 98-102, Janvier - Février 2001, Fondamental

Auteur(s) : Gilbert ALIBERT, Zéphirin MOULOINGUI, René GRISON, Michel ROMESTAN, Laboratoire de biotechnologie et amélioration des plantes (BAP), USC INRA-ENSAT, Pôle de biotechnologie végétale, 18, chemin de Borde-Rouge, BP 107, 31326 Castanet Tolosan, France.

Résumé : Les acides gras produits par hydrolyse chimique des lipides des plantes sont des matériaux de base pour l'industrie des biocarburants, des lubrifiants, des plastiques, des détergents et également des adjuvants de préparations commerciales d'herbicides. Cependant les procédés actuels de production des acides gras sont hautement polluants et coûteux en énergie. Dans ce travail nous développons un nouveau procédé de production des acides gras mettant en œuvre des plantes génétiquement modifiées. Nous avons introduit dans le tabac, retenu comme plante modèle, une construction génétique comprenant un gène de lipase (de la levure *Geotrichum candidum*) sous le contrôle d'un promoteur graine spécifique (promoteur AtEm1 d'*Arabidopsis thaliana*). Ce promoteur devrait permettre l'expression du gène de lipase au niveau de l'axe embryonnaire tandis que les lipides s'accumulent dans les corps lipidiques des cotylédons. Dans ces conditions, les lipides de la graine devraient être séparés de la lipase par une compartimentation tissulaire et ne pas interférer. Après broyage des graines on peut penser que la mise en contact des lipides et de la lipase conduira à la libération d'acides gras. Plusieurs transformants ont été produits par transfert de gène à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, quelques-uns d'entre eux exprimant, comme attendu, la lipase dans leurs graines. Trois clones (2, 19 et 43) présentent une activité lipase significative et ont été retenus pour des études complémentaires. Cependant l'activité enzymatique observée est faible et certains clones présentent un défaut de compartimentation entre l'enzyme et les lipides se traduisant par la production d'acides gras dans la graine intacte. Lorsque les graines du clone 43 sont broyées dans un tampon, des acides gras sont produits dans le milieu réactionnel, validant le procédé imaginé. De nouvelles constructions réalisées, soit par optimisation du promoteur AtEm1, soit par la mise en œuvre de nouveaux promoteurs, sont prévues et seront testées chez le tabac, avant de tenter leur introduction chez les plantes d'intérêt agronomique telles que le colza et/ou le tournesol. D'autre part, il est nécessaire d'optimiser la réaction enzymatique qui pourrait se dérouler dans un réacteur multifonction réalisant à la fois l'hydrolyse des lipides et l'extraction des acides gras produits.

Mots-clés : oléagineux, graines de tabac, triglycérides, acides gras, lipase, génie génétique.

Summary : Fatty acids produced by chemical hydrolysis of the plant lipids are starting materials for the industry of biocarburants, biolubricants, plastics, detergents and also as adjuvants in commercial preparation of herbicides. However the actual process used for industrial production of fatty acids from plant lipids are highly pollute and energy consuming. In this work we tested a new process of fatty acid production involving genetically modified plants. Using tobacco as a model plants we introduced a genetic construct containing a lipase gene (from the yeast *Geotrichum candidum*) under the control of a seed specific promotor (promotor AtEm1) from *Arabidopsis thaliana*. This promotor would allow the expression of the lipase gene in the embryo axis of the seeds while lipids reserves accumulate in the oilbodies in the cotyledon. Thus in vivo the lipids would be separated from the enzyme by tissular compartmentation. Upon grinding it is assumed that contact between the lipase and the lipids would result in fatty acid production. Several transformants were produced by *Agrobacterium tumefaciens* infection, some of them expressing the lipase gene. Three of them (clones 2, 19 and 43) showed a significant lipase activity and were retained for future researches. When seeds of clone 43 were ground in a buffer, fatty acids were produced as it was postulated . However the fatty acid yield was low and some transformants showed a defect in compartmentation of the lipase accumulation. New constructs involving modification of the AtEm1 promotor or other new promoters are planed before introduction of the genetic construct into agronomically interesting plants such as rape and/or sunflower. Moreover improvements of the enzymatic reaction conditions are needed. The reaction could occurred inside a multifunctional reactor performing both lipid hydrolysis and rapid extraction of the produced fatty acids.

Keywords : lipids, lipase, tobacco, genetic engineering.

ARTICLE

Introduction

Les acides gras issus des huiles végétales constituent la matière première d'une industrie chimique très diversifiée et en pleine évolution. En effet, ils conduisent à des produits aussi divers que des agents de surface, additifs pour matières plastiques, lubrifiants, produits cosmétiques et pharmaceutiques, peintures et vernis, biocarburants, adjuvants phytosanitaires, lipochimie, etc. [1].

Actuellement les acides gras sont obtenus par hydrolyse chimique selon un processus qui comprend les étapes suivantes :

- trituration des graines par pressage suivie de l'extraction de l'huile en présence de solvants organiques (hexane, isopropanol, éthanol) [2]. Cette étape conduit à un premier sous-produit, le tourteau ;
- hydrolyse catalytique des triglycérides dans des conditions drastiques de température, pression, etc., pour libérer les acides gras. Cette étape génère un sous-produit, le glycérol, qu'il est nécessaire ensuite de valoriser [3, 4] ;
- purification des acides gras par distillation fractionnée ou cristallisation fractionnée.

Ce processus, présente plusieurs inconvénients parmi lesquels :

- un nombre important d'étapes qui séparent la matière première (la graine) du produit fini (les acides gras) ;
- un coût en énergie élevé, nécessaire pour réaliser les transformations oléochimiques et les purifications.

Ces éléments conduisent à un prix de revient élevé des acides gras qui apparaissent alors non compétitifs par rapport aux composés issus de la pétrochimie.

Un autre procédé pourrait consister à utiliser, comme matériel de départ pour l'hydrolyse des triglycérides, les graines d'oléagineux directement après broyage, sans extraction préalable de l'huile, comme cela a été décrit dans un protocole de transestérification acido-catalysée chez le tournesol [5]. Ce procédé supprime les étapes de trituration/extraction mais ne répond pas aux autres inconvénients.

Une autre possibilité consiste à utiliser des enzymes du type lipase pour réaliser l'hydrolyse des triglycérides. Cette méthode a été validée en retenant des lipases plus ou moins purifiées de micro-organismes [6-8] ou de plantes [9]. Ce procédé répond à certains des inconvénients de l'hydrolyse chimique, en particulier à ceux du coût énergétique de l'hydrolyse et de la pollution engendrée par les catalyseurs, mais ne résout pas le problème de la multiplicité des étapes et surtout s'avère d'une mise en œuvre difficile (production préalable de lipase par des micro-organismes ou des plantes, extraction et purification de l'enzyme).

Pour répondre à cette dernière difficulté une alternative consiste à utiliser des homogénats bruts de graines d'oléoprotéagineux particuliers comme le ricin ou la nigelle qui contiennent des lipases endogènes à l'état natif [10-12]. Pour les autres oléagineux pour lesquels les lipases ne sont produites qu'au moment de la germination, le procédé reste inapplicable. Les avancées du génie génétique permettent d'envisager aujourd'hui la transposition de ce procédé à n'importe quelle plante oléo-protéagineuse [13] après transfert dans le génome de la plante d'un gène de lipase sous le contrôle d'un promoteur graine spécifique. Les lipases produites dans la graine seraient alors susceptibles d'hydrolyser les lipides de réserve en acides gras mais de telles plantes ne seraient viables que si la lipase est stockée à l'intérieur de la graine dans un compartiment tissulaire ou cellulaire différent de celui où s'accumule l'huile, de façon à éviter tout contact entre l'enzyme et son substrat tout au long de la vie de la plante. Cette hydrolyse n'aurait lieu que lors du broyage de la graine qui mettrait alors en contact la lipase et l'huile.

Ce procédé pourrait répondre à l'ensemble des inconvénients des méthodes actuellement utilisées ou décrites : nombre d'étapes réduit (pas de nécessité d'extraction préalable de l'huile), faible coût énergétique (la réaction enzymatique s'effectue à 37 °C), absence de pollution (la lipase est biodégradable).

Sur la base de ce protocole, un programme de validation du procédé a été mis en place. Cette publication décrit les premiers résultats obtenus sur une plante oléagineuse modèle, le tabac, dans lequel un gène de lipase de la levure *Geotrichum candidum*, sous contrôle d'un promoteur graine spécifique issu d'*Arabidopsis thaliana*, a été introduit.

Matériel et méthode

Matériel biologique

Le tabac (*Nicotiana tabacum*) variété Wisconsin 38 a été retenu comme matériel expérimental.

Le transfert de gène chez le tabac est effectué par *Agrobacterium tumefaciens*, souche LBA 4404 (origine Biogemma, Mondonville, France).

Le gène de la lipase 1 (plasmide YpDC420) de la levure *Geotrichum candidum*, souche ATCC 34614 (N° Genbank UO2622), a été fourni par T. Vernet (NRC, Montréal, Québec, Canada).

Le promoteur AtEm1 (plasmide pEm1.1443) d'*Arabidopsis thaliana* (N° Genbank Z11158) provient du laboratoire CNRS de Perpignan (France), Dr M. Delseny.

Le terminateur est celui de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (N° Genbank V0087).

Méthode

* *Constructions génétiques.* Le plasmide pG-1-34614, contenant la construction désirée encadrée par les sites HindIII et EcoRI, est obtenu par digestions et ligations successives à partir des différents éléments cités précédemment. La cassette d'expression est ensuite introduite dans le plasmide binaire pBin19 [14] (*figure*). Le plasmide pBin19 est enfin transféré dans *Agrobacterium tumefaciens*.

* *Transformation génétique du tabac.* Elle est réalisée selon la méthode des « disques foliaires » décrite par Horsch [15]. Les plantes transgéniques sont sélectionnées sur 50 mg/l de kanamycine et les plantes résistantes élevées en serre. À la floraison les plantes sont autofécondées et les graines récupérées.

* *Analyses en Southern.* L'ADN est extrait selon le protocole décrit par Fulton *et al.* [16] et digéré par HindIII et EcoRI. Les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,25 %. La sonde lipase est obtenue par PCR après marquage à la digoxigénine.

* Détermination de l'activité lipase

Préparation de l'extrait enzymatique. L'activité lipase est déterminée sur des graines de tabac transgéniques et non transgéniques de la même variété, prises comme témoins. Trente mg de graines sont broyées au Potter dans 0,8 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7. Le broyat est centrifugé 5 min à 4 000 g et le surnageant traité trois fois par de l'hexane (V/V) pour extraire les lipides endogènes. Dix µl de surnageant sont prélevés pour la mesure de la teneur en protéines et 0,6 ml sont retenus pour la réaction enzymatique.

Réaction d'hydrolyse. Le substrat retenu est la trioléine. Deux mg de substrat sont introduits dans un flacon en verre de 1,5 ml contenant un barreau aimanté de 8 mm recouvert de téflon. On ajoute 0,6 ml d'extrait enzymatique et le milieu réactionnel est simultanément placé sous agitation magnétique (300 rpm) et soniqué (appareil type VibraCell, 600 W, 20 Kz, Bioblock Scientific), muni d'une sonde (REUS, contes, France) pendant 1 min. La réaction se poursuit à 37 °C sous agitation magnétique (300 rpm) pendant 40 min. La lipolyse est arrêtée par addition de 20 µl d'HCl 2N. Les produits de la réaction sont extraits par le chloroforme (3 extractions, V/V).

Séparation et dosage des produits réactionnels. L'analyse est effectuée par chromatographie en phase gazeuse (Autosystem Perkin Elmer, injecteur « on Column », détecteur ionisation de flamme et logiciel d'acquisition et de traitement de données Maestro II Chrompack, Int.), sur colonne BPX-5 (032 id X 12 m, 0,25 m d'épaisseur de film, SGE Villeneuve-Saint-Georges, France) dans les conditions suivantes : injecteur température initiale 40 °C puis gradient de 200 °/min jusqu'à 340 °C, four température initiale 55 °C puis gradient de 45 °/min jusqu'à 80 °C puis 10 °/min jusqu'à 360 °C. Cette température est maintenue 16 min. La température du détecteur est de 365 °C. Le gaz vecteur est l'hélium à une pression d'entrée de 10 Psi.

Ce programme permet de séparer les acides gras, les monoglycérides, les diglycérides et les triglycérides. Le dosage se réfère à un étalon interne, l'heptadécane.

* *Hydrolyse des lipides de la graine in situ.* Les conditions de broyage des graines, la réaction enzymatique et l'analyse des produits réactionnels sont identiques aux précédentes mais le broyat n'est pas centrifugé et l'extraction par l'hexane omise. Dans ces conditions la lipase endogène agit directement sur les lipides de la graine.

* *Détermination de la teneur en protéines.* La teneur en protéines est mesurée par le test *BioRad Protein assay* en se référant à une gamme étalon réalisée à partir de sérum albumine de bœuf.

Résultats

Le tabac est une plante oléagineuse modèle

Une analyse de la constitution des graines de tabac montre que cette plante contient environ 25 % de protéines et 45 % de lipides. Cette constitution est proche d'un oléoprotéagineux comme le colza (40 % de protéines et 45 % de lipides) [17]. Le tabac peut donc être retenu comme plante modèle pour la validation du process proposé.

Production de clones de tabac contenant le gène de la lipase 1 de Geotrichum candidum

Après infection par *Agrobacterium tumefaciens* (tableau), 49 plantes résistantes à la kanamycine ont été régénérées. Quarante et une d'entre elles contiennent dans leur génome la construction chimérique, détectée par analyse en Southern mais 14 de ces plantes n'ont pas donné de graines. L'activité lipase a été déterminée sur 25 plantes, deux n'ayant pas fourni une quantité de graines suffisante pour réaliser un extrait enzymatique. Sur les 25 plantes analysées, 10 n'ont pas présenté d'activité lipase détectable, 12 ont une activité lipase faible et 3 (clones 2, 18 et 43) une bonne activité. Par ailleurs les graines de certains clones (7, 14, 29, 41, et 42), contiennent une quantité anormalement élevée d'acides gras libres comparativement aux graines témoins non transgéniques.

Production d'acides gras par auto-hydrolyse des lipides des graines par la lipase endogène

Le clone 43 a été retenu pour ces expérimentations. Les graines broyées et incubées directement en milieu tamponné libèrent des acides gras. Dans les conditions expérimentales retenues, une production de 120 mug d'acides gras par gramme de graines est régulièrement obtenue en 40 min d'hydrolyse.

Discussion

Les résultats obtenus montrent, chez un oléoprotéagineux modèle, le tabac, qu'il est possible de faire produire dans les graines de cette plante une lipase, capable de dégrader l'un de ses substrats de réserve, les lipides, sans affecter sa viabilité. En effet, la construction génétique retenue permet une expression compartimentée de l'enzyme qui n'interfère pas avec son substrat dans la graine intacte. Les plantes transgéniques sont fertiles et produisent des graines. L'autolyse des lipides ne se produit que lors du broyage des graines. Par ailleurs, pour les trois clones qui présentent une bonne activité lipase, les graines possèdent un pouvoir germinatif équivalent à celui des plantes témoins non transgéniques (c'est-à-dire supérieur à 95 %). Ces plantes pourront donc être multipliées, d'une part, en vue d'obtenir une masse de graine suffisante pour poursuivre les études d'hydrolyse et, d'autre part, pour analyser le comportement du matériel génétique introduit au cours des générations.

Au niveau des résultats, il faut remarquer que seuls trois clones (2, 18 et 43) présentent des activités lipases significatives permettant une exploitation ultérieure. Pour les clones 7, 14, 29, 41 et 42 qui contenaient dans leurs graines des teneurs anormalement élevées en acides gras, on peut penser à un défaut de compartimentation entre la lipase et les lipides peut-être dû à un mauvais fonctionnement du promoteur AtEm1. Dans ce cas, un début d'hydrolyse *in vivo* des lipides serait responsable de la présence de ces acides gras même si, par ailleurs, aucune activité lipase n'est décelable.

Cette première expérimentation, outre de montrer la validité du concept, permet d'éclairer les futures voies de recherche. Il semble en effet nécessaire de produire un grand nombre de transformants de façon à disposer d'un large choix de clones ne présentant pas de failles dans leur fonctionnement comme, par exemple, un mauvais contrôle de l'expression du gène par le promoteur. Par ailleurs, les activités lipases relevées dans les différents clones de tabac restent insuffisantes pour une hydrolyse optimale des lipides de la graine dans un temps raisonnable. Une première action serait d'agir au niveau du promoteur soit en optimisant le promoteur AtEm1, soit en retenant un autre promoteur, si possible homologue de la plante hôte (par exemple le promoteur de la napine dans le cas du colza [18] ou le promoteur Hads 10G1 dans le cas du tournesol [19]). Des constructions de ce type ont déjà été réalisées avec le promoteur de la napine (origine Pr Rask, Uppsala, Suède). Enfin, nous avons pu remarquer que, lors de la réaction enzymatique conduite sur des homogénats bruts de graines, l'activité enzymatique est fortement réduite par rapport à celle déterminée sur un extrait enzymatique purifié par centrifugation. De plus, la réaction enzymatique s'arrête très rapidement. Ces dernières observations nous montrent la nécessité de déterminer des conditions réactionnelles optimales en éliminant si possible des inhibiteurs potentiels des graines. Aussi la conception d'un réacteur enzymatique dans lequel les acides gras sont retirés rapidement du milieu de réaction est une approche expérimentale du dispositif qui contribuera à améliorer la réactivité chimique et la production des acides gras et du glycérol.

CONCLUSION

Tester de nouveaux promoteurs, introduire ces nouvelles constructions dans des plantes agronomiquement importantes (colza d'abord, tournesol ensuite) et mettre au point un réacteur enzymatique efficace constituent les principaux objectifs des futures recherches.

Remerciements

Nous tenons à remercier M. Jean Laumonier de l'ASEDIS SO pour son soutien constant apporté à ce projet. Ce travail fait l'objet d'un soutien financier de la part de l'Ademe (Convention Agricole n° 9501036) et de l'Inra, Département transformation des produits végétaux, AIP VANA n° P0080.

REFERENCES

1. JOHNSON RW, FRITZ E, eds (1989). *Fatty acids in Industry - Processes, Properties, Derivatives, Applications*. New York, Basel : Marcel Dekker, Inc.
2. WAN PW, WAKELYN PJ (1997). *Technology and solvents for extracting oil seeds and nonpetroleum oils*. AOCs Press.
3. MOULOINGUI Z, YOO JW, GACHEN C, GASET A, VERMEERSCH G. Process for the preparation of glycerol carbonate from glycerol and a cyclic organic carbonate, especially ethylene or propylene carbonate. EP 07 39888A FR 2733232A.
4. CLAUDE S, MOULOINGUI Z, YOO JW, GASET A (2000). Method for preparing glycerol carbonate. US 6025 504.
5. HARRINGTON KJ, D'ARCY-EVANS C (1985). A comparison of conventional and *in situ* methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. *J Am Oil Chem Soc*, 62 : 1009-13.
6. GRAILLE J, BEDIE F, NAUDET M (1971). Étude des acides oxydés présents dans les corps gras bruts. II - Obtention, sans altération de structure, des esters méthyliques oxydés dépourvus de constituants insaponifiables. *Rev Fr Corps Gras*, 8.9 : 537-45.
7. KIM SM, RHEE JS (1991). Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system. *J Am Oil Chem Soc*, 68 : 499-503.
8. GANCET C (1991). Catalysis with immobilized enzymes : hydrolysis and esterification by *Rhizopus arrhizus*. In : *Heterogeneous catalysis and fine chemicals*. Vol.II. Amsterdam : Elsevier Science Publisher, BV.
9. HILLS MJ, KIEWITT I, MUKHERJEE KD (1991). Synthetic reactions catalysed by immobilized lipase from oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Appl Biochem Biotech*, 27 : 123-9.
10. RAO KVSA, PAULOSE MM, LAKSHMINARAYANA (1990). *In situ* lipolysis of castor oil in homogenised castor seeds. *Biotechnol Lett*, 12 : 377-80.
11. RAO KVSA, PAULOSE MM (1992). A process for splitting of castor oil at ambient temperature using homogenised castor seed as lipase source. *Res and Ind*, 37 : 36-7.

12. MERT S, DANDIK L, AKSOY HA (1995). Production of glycerides from glycerol and fatty acids by native lipase of *Nigella sativa* seed. *Appl Biochem Biotechnol*, 50 : 333-42.
13. ALIBERT G, MOULOINGUI Z, BOUDET AM (1996). Method for producing fatty acids or derivatives thereof from oil plants. Brevet international WO 96/03511.
14. BEVAN M (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acid Research*, 12 : 8711-21.
15. HORSCH RB, FRY JE, HOFFMAN NL, EICHHOLTZ D, ROGERS SG, FRALEY RT (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227 : 1229-31.
16. FULTON TM, CHUNWONGSE J, TANKSLEY SD (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Pl Mol Bio Rep*, 13 : 207-9.
17. FREGA N, BOCCI F, CONTE LS, TESTA F (1991). Chemical composition of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L). *J Am Oil Chem Soc*, 68 : 29-33.
18. ELLERSTRÖM M, STALBERG K, ESCURRA I, RASK L (1996). Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Pl Mol Biol*, 32 : 1019-27.
19. PRIETO-DAPENA P, ALMOGUERA C, ROJAS A, JORDANO J (1999). Seed-specific expression patterns and regulation by ABI3 of an unusual late embryogenesis - abundant gene in sunflower. *Pl Mol Biol*, 39 : 615-27.

Illustrations

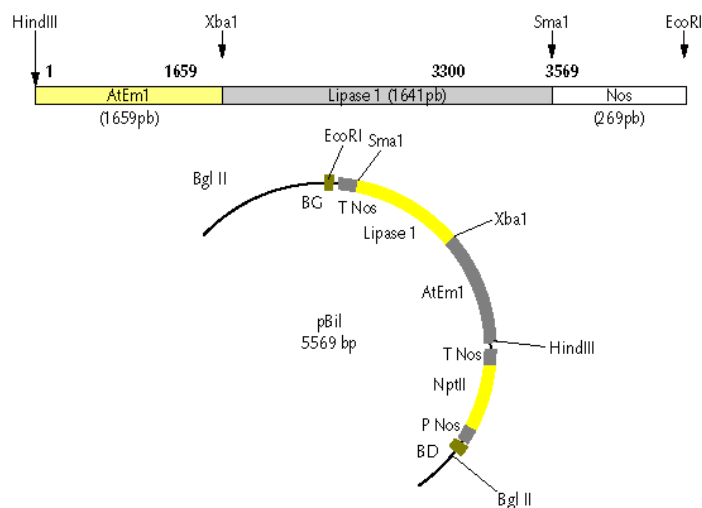


Figure. Construction et structure du vecteur pBil contenant le gène de la lipase I de *Geotrichum candidum* sous contrôle du promoteur AtEm1.

Tableau . Analyse des clones de tabac résistants à la kanamycine : présence de l'insert, production de graines et activité lipase.

N° du clone	Présence de l'insert	Production de graines	Activité lipase mg/mg de protéines
1	+	+	5,8
2	+	+	14
3	+	+	0
4	-	-	nd
5	+	+	0,2
6	+	+	0
7	+	+	2,3
8	-	-	nd
9	+	+	0
10	+	-	nd
11	+	-	nd
12	+	+	2,5
13	+	-	nd
14	+	+	nd
15	+	+	5,3
16	+	+	3,8
17	+	-	nd
18	+	+	18,4
19	-	-	nd
20	+	+	nd
21	+	-	nd
22	-	-	nd
23	+	+	0
24	+	+	0
25	-	-	nd
26	+	-	nd
27	+	-	nd
28	+	+	0
29	+	+	0
30	+	+	0
31	+	+	0
32	+	-	nd
33	+	-	nd
34	+	-	nd
35	+	+	0,9
36	+	+	0
37	+	-	nd
38	-	-	nd
39	+	-	nd
40	+	-	nd
41	+	+	0
42	+	+	0
43	+	+	12,8
44	+	+	0
45	+	-	nd
46	+	-	nd
47	+	+	0
48	+	+	0
49	-	-	nd

Moyenne de trois déterminations.

Nd : activité non déterminée.

+ : présence.

- : absence.