

50376  
1983  
135

50376  
1983  
135

N° d'ordre : 1112

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3ÈME CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Michel ZYGMUNT

Sujet :

- PHYSIOLOGIE DE CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM -  
APPLICATION AU COUPLAGE CELLULOLYSE-PRODUCTION DE BUTANOL



Soutenu le 24 Novembre 1983 devant la Commission d'examen

Jury :

Président : Monsieur J. MONTREUIL

Examineurs : Messieurs G. ALBAGNAC  
J. GUILLAUME  
J.P. VANDECASTEELE

SCD LILLE 1



D 030 289193 4

- REMERCIEMENTS -

Je remercie très vivement :

L'AGENCE FRANCAISE POUR LA MAITRISE DE L'ENERGIE qui, en m'allouant une bourse, a participé à la réalisation de cette thèse.

Monsieur **MONTREUIL**, Professeur de Chimie Biologique, qui a accepté de présider le jury de ma thèse, aboutissement d'une première phase de ma vie scientifique. Il en a été l'un des principaux acteurs par l'enseignement qu'il m'a dispensé.

Monsieur **ALBAGNAC**, Directeur de la Station de Technologie Alimentaire, qui a bien voulu m'intégrer dans son équipe de l'I.N.R.A. de VILLENEUVE D'ASCQ. Il m'a toujours encouragé et conseillé.

Monsieur **GUILLAUME**, Professeur à l'Université de LILLE I et Monsieur **VANDECASTEELE**, Ingénieur à l'Institut Français du Pétrole, qui ont accepté de participer à mon jury en raison de leur intérêt pour les fermentations bactériennes, en particulier acétonobutylique.

Je tiens à honorer la mémoire de Monsieur **MORFAUX** qui fut Directeur de la Station de Technologie Alimentaire. Il a été l'initiateur de mon sujet et a permis mon intégration au sein de l'équipe I.N.R.A. de LILLE.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Monsieur **DUBOURGUIER** pour les enseignements et les conseils qu'il m'a prodigués.

Messieurs **MOLETTA**, **SAMAIN**, **TOUZEL** et **VERRIER** ont toujours accepté de discuter avec moi de mes travaux. Ils ont aussi, à des degrés divers, participé à la réalisation de cette thèse et je les en remercie très chaleureusement.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui, par leur compétence, ont permis l'exécution de ce travail, particulièrement Melle **SURMONT** qui a assuré avec beaucoup d'efficacité la dactylographie de ce mémoire et Monsieur **LEPOUTRE** que j'ai souvent mis à contribution pour le suivi analytique.

Enfin, toutes les personnes de l'I.N.R.A. que je n'ai pas nommées et qui m'ont aidé à réaliser mes travaux dans une ambiance à la fois studieuse et amicale. Je n'oublierai pas ces trois années passées avec eux.



- PLAN -

Pages

- INTRODUCTION -

- CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE -

<u>I.- MICROBIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DES BACTERIES SOLVANTOGENES</u>	4.-
I.1.- Taxonomie des bactéries solvantogènes	4.-
I.2.- Sensibilité à l'oxygène	8.-
I.3.- Nutrition	9.-
a.- Substrat carboné	
b.- Facteurs de croissance	
c.- Source carbonée	
I.4.- Bactériocine	12.-
I.5.- Bactériophages	13.-
I.6.- Toxicité du butanol	13.-
<u>II.- CINETIQUE ET BIOCHIMIE DE LA FERMENTATION ACETONOBUTYLIQUE</u>	15.-
<u>II.1.- Fermentation typique</u>	15.-
II.1.1.- Cinétique	
II.1.2.- Changement de morphologie de <u>Clostridium acetobutylicum</u> en culture discontinue - Relation entre sporulation et production de solvants	
a.- Changement morphologique	
b.- Relation sporulation-production de solvants	
<u>II.2.- Influence des conditions de culture</u>	18.-
II.2.1.- Influence des composés du milieu	
II.2.2.- Influence du pH et de la concentration en acides	
a.- En culture discontinue	
b.- En culture continue	
<u>II.3.- Assimilation des sucres</u>	20.-
<u>II.4.- Voies métaboliques</u>	23.-
II.4.1.- Formation de l'acétate et du butyrate à partir de l'acétyl CoA	
II.4.2.- Production d'acétone et d'isopropanol	
II.4.3.- Production de butanol et d'éthanol	

- II.4.4.- Activités NADH - Ferredoxine oxydoréductasique
- II.4.5.- Métabolisme de type acide
- II.4.6.- Métabolisme de type solvant
- II.4.7.- Bilan énergétique
- II.4.8.- Bilans des équivalents réducteurs

III.- ASPECTS TECHNOLOGIQUES 31.-

III.1.- Utilisation des substrats 31.-

III.2.- Rendement 34.-

III.3.- Utilisation des résidus 35.-

- CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES -

I.- TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES 36.-

I.1.- Techniques générales 36.-

- a.- Isolement
- b.- Culture en flacons pénicilline
- c.- Culture en fermenteur

I.2.- Techniques de mutagenèse 37.-

- a.- Ethyl Méthane Sulfonate (EMS)
- b.- Gradient en boîte

I.3.- Conditions de culture 38.-

- I.3.1.- Température
- I.3.2.- pH
  - a.- Souche solvantogène
  - b.- Souche cellulolytique

II.- MILIEU DE CULTURE 39.-

II.1.- Milieu pommes de terre 39.-

II.2.- Milieu mélasses 39.-

II.3.- Milieu semi-synthétique 40.-

II.4.- Milieu K2 41.-

II.5.- "Reinforced Clostridial Medium" : RCM 41.-

<u>III.- TECHNIQUES ANALYTIQUES</u>	42.-
<u>III.1.- Dosage des sucres</u>	42.-
<u>III.2.- Dosage des acides gras volatils et du butanol</u>	42.-
<u>III.3.- Dosage de l'acétone, de l'éthanol et de l'isopropanol</u>	43.-
<u>III.4.- Dosage de l'acide lactique</u>	43.-
<u>III.5.- Dosage des gaz (hydrogène, gaz carbonique)</u>	44.-
<u>III.6.- Mesure du volume de gaz dégagé</u>	44.-
<u>III.7.- Mesure de la biomasse bactérienne</u>	44.-
<u>III.8.- Estimation de la cellulose</u>	44.-

- CHAPITRE III : RESULTATS -

I.- ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE SOUCHES SOLVANTOGENES SAUVAGES

<u>I.1.- Isolements</u>	45.-
I.1.1.- Isolement de bactéries xylanolytiques	
I.1.2.- Isolement de souches sporulées amylolytiques	
<u>I.2.- Caractérisation des isolats</u>	47.-
I.2.1.- Galerie API 20A	
I.2.2.- Fermentation des glucides en flacon	
a.- Fermentation du glucose	
b.- Autres glucides fermentés	
I.2.3.- Influence de la température sur le taux de croissance	
I.2.4.- Etude du taux de croissance et de la production de solvants en fonction du pH	
I.2.5.- Cinétique de dégradation du glucose	
I.2.6.- Conclusion	

II.- ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE SOUCHE TOLERANTE AU BUTANOL

<u>II.1.- Obtention du mutant B6</u>	55.-
<u>II.2.- Influence du butanol sur la croissance</u>	56.-
<u>II.3.- Caractérisation cinétique de la souche B6</u>	56.-
<u>II.4.- Conclusion</u>	57.-

### III.- INFLUENCE DES CONDITIONS INITIALES DE CULTURE SUR LES PRODUCTIONS DE SOLVANTS

<u>III.1.- Influence des acides sur la production de solvants par 6 x B6</u>	
III.1.1.- Etude en tubes	59.-
III.1.2.- Etude en fermenteurs	64.-
<u>III.2.- Influence des acides sur le taux de croissance de la souche B6</u>	
III.2.1.- Acides seuls	
III.2.2.- Mélanges d'acides	
<u>III.3.- Conclusion</u>	67.-

### IV.- INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU SUBSTRAT SUR LES PRODUCTIONS DE SOLVANTS PAR LA SOUCHE B6

IV.1.- Sucres seuls	70.-
IV.2.- Mélange de sucres	71.-
IV.3.- Conclusion	72.-

### V.- CO-CULTURES ENTRE UNE BACTERIE SOLVANTOGENE ET UNE BACTERIE CELLULOLYTIQUE MESOPHILE

<u>V.1.- Isolement et caractérisation d'une souche mésophile cellulolytique</u>	73.-
V.1.1.- Isolement	
V.1.2.- Caractéristiques morphologiques et culturelles de la souche MC4	
V.1.3.- Caractérisation cinétique	
V.1.4.- Conclusion	
<u>V.2.- Association entre la souche MC4 et la souche B6</u>	77.-
V.2.1.- Essai de couplage sans addition de butyrate	
V.2.2.- Essai de couplage avec addition de 6 g/l de butyrate	
V.2.3.- Conclusion	

- CONCLUSION -

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

- I N T R O D U C T I O N -

-§-§-§-§-§-



- INTRODUCTION -

Historiquement, c'est PASTEUR (1862) qui, étudiant les ferments butyriques, a mis en évidence le n-butanol comme produit de fermentation.

Puis, à la veille de la première guerre mondiale, FERNBACH et ses collaborateurs montrent que la formation du butanol s'accompagne de la production d'acétone et isolent ainsi les premières souches amylolytiques utilisables industriellement. WEIZMANN (1912) isole et caractérise une bactérie Clostridium acetobutylicum possédant une productivité en solvants nettement supérieure aux souches de FERNBACH. Il dépose le premier brevet de fabrication industrielle du butanol par fermentation.

Jusqu'en 1920, la fermentation a pour objectif de produire l'acétone qui entre dans la fabrication de la cordite et des vernis celluloses.

Pendant la seconde guerre mondiale, on s'intéresse plutôt à la production de butanol comme matière première pour la fabrication du caoutchouc synthétique. Après la guerre, la production de butanol par voie fermentaire a été abandonnée, exceptée en Afrique du Sud, au profit de la synthèse chimique.

Actuellement, bien que les prix des produits pétroliers aient subi une augmentation considérable, la synthèse chimique reste énergétiquement et économiquement plus intéressante que la fermentation (BOBICHON, 1981). Le principal intérêt de cette dernière est d'utiliser comme produits de départ des substrats renouvelables (sucres ou polysaccharides de réserve). Cependant, son développement industriel soit pour l'obtention d'un tiers solvant entrant dans la composition de carburants de substitution soit comme matière première de l'industrie chimique se heurte à trois limitations :

- l'incapacité des souches actuelles à hydrolyser les biomasses bon marché (résidus ligno-cellulosiques en particulier),
- une tolérance réduite des micro-organismes aux solvants produits,
- l'absence de procédés performants.

C'est sur ces trois axes que portent les efforts de recherche actuels. Il faut enfin noter que la distillation des moûts fermentés génère une quantité importante de vinasses fortement concentrées. La méthanisation apparaît comme une filière bien adaptée au couplage valorisation énergétique-dépollution de ce type de résidus.

Dans ce travail de thèse, après avoir fait le point sur les acquis scientifiques récents, nous nous sommes fixés trois objectifs :

- L'isolement et la caractérisation de souches solvantogènes.
- Leur étude physiologique, en précisant notamment l'influence sur les productions de solvants des acides acétique et butyrique et de la composition en sucres du milieu. L'amélioration par mutagenèse des souches isolées a aussi été envisagée.

- L'association entre bactéries cellulolytiques et bactéries solvantogènes.

- C H A P I T R E I -

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

-§-§-§-§-



CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I - MICROBIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DES BACTERIES SOLVANTOGENES

I - 1. TAXONOMIE DES BACTERIES SOLVANTOGENES (BUCHANAN et GIBBONS,  
1974 ; HOLDEMAN et al., 1977 ; GEORGE et al., 1983)

Plusieurs espèces de bactéries anaérobies, réparties dans plusieurs genres, sont capables de produire des solvants (Tableau I). Chez les non-sporulées, on les trouve parmi les genres Eubacterium, Treponema et Fusobacterium. Chez les sporulées, on les trouve parmi le genre Bacillus mais les espèces les plus nombreuses et les plus intéressantes pour la synthèse de butanol appartiennent toutes au genre Clostridium.

Les Clostridia se divisent en quatre groupes, basés sur la protéolyse, la saccharolyse et la position de la spore (ROSS, 1961) :

- spore subterminale : Groupes 1 et 2
- spore terminale : Groupes 3 et 4

L'ensemble de ces critères est résumé dans la figure ci-après :

TABLEAU I : Solvants produits par les souches appartenant aux genres :  
BACILLUS, EUBACTERIUM, FUSOBACTERIUM & TREPONEMA

	S O L V A N T S P R O D U I T S				G + C %
	Acétone	Ethanol	Propanol	Butanol	
<u>Genre BACILLUS</u>					
bactérie anaérobie facultative					
Gram (+) sporulée					
<i>Bacillus macehans</i>	+	+			49 - 51
<u>Genre EUBACTERIUM</u>					
bactérie anaérobie stricte					
Gram (+) non sporulée					
<i>E. combesii</i>		+	+		+
<i>E. limosum</i>			+		
<i>E. saburreum</i>		+			
<u>Genre FUSOBACTERIUM</u>					
bactérie anaérobie stricte					
Gram (-) non sporulée					
<i>F. bullosum</i>				+	
<i>F. mortiferum</i>				+	26 - 28
<i>F. symbiosum</i>		+		+	48
<u>Genre TREPONEMA</u>					
bactérie anaérobie stricte					
Gram (-) non sporulée					
<i>T. phagedenis</i>		+	+	+	39 - 39

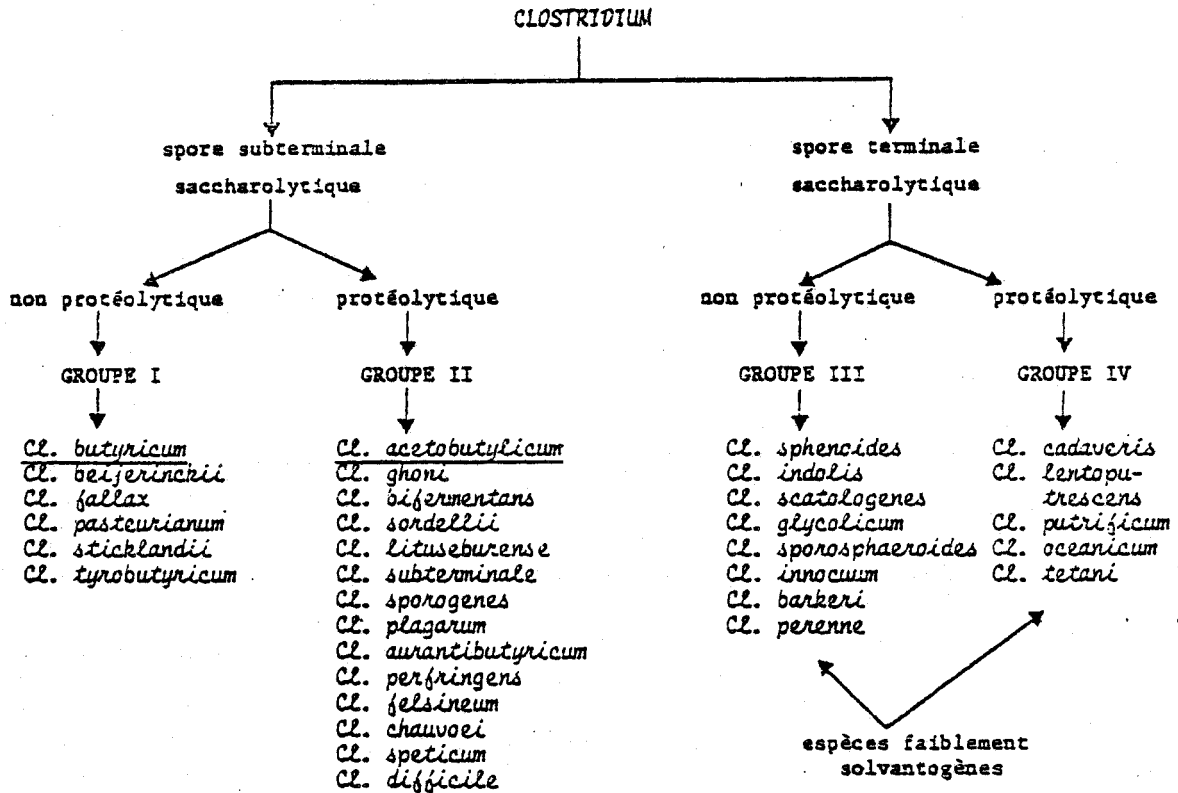


Schéma de classification des Clostridium solvantogènes

Les espèces qui peuvent présenter un intérêt pour la production de solvants se limitent à Clostridium butyricum et Clostridium acetobutylicum. Les autres ne produisent que de faibles quantités de solvants. Clostridium butyricum se caractérise dans le groupe I (Tableau III a) par sa capacité à utiliser les sucres suivants : maltose, mannose, raffinose, lactose, ribose et amidon. Les autres souches du groupe I citées n'utilisent pas ces six sucres simultanément. La série de sucres retenus pour l'identification ne reflète pas de façon exhaustive les capacités fermentaires de ce Clostridium. Clostridium butylicum est une souche de Clostridium

butyricum (GOTTSCHALK et al., 1981). Elle se distingue de cette dernière par la réduction de l'acétone en isopropanol sous l'action de l'isopropanol déshydrogénase.

Dans le groupe II (Tableau III b), Clostridium acetobutylicum se caractérise par l'utilisation du glucose, mannose, maltose, lactose et salicine. Une autre bactérie, Clostridium chauvoei, présente aussi le même profil. Mais plusieurs critères complémentaires d'utilisation des sucres comme le xylose, le ribose, le raffinose et l'arabinose permettent de les différencier. Le profil fermentaire permet également de distinguer Clostridium acetobutylicum de clostridium chauvoei ; sur milieu peptone - extrait de levure - glucose (PYG), Clostridium acetobutylicum produit de l'acétate, du butyrate et du butanol tandis que Clostridium chauvoei produit de l'acétate, du butyrate et du formate (HOLDEMANN et al., 1977).

Une série de souches d'intérêt industriel ayant donné des procédés brevetés aux Etats-Unis, ont été rapportées par BEESCH (1952). Pratiquement toutes ces souches ont été cultivées sur mélasse ou mélasse invertie (Tableau IV). Leur nom d'espèce n'est reconnu par aucune classification et à la lumière de leurs profils fermentaires, on peut considérer qu'il s'agit de souches de Clostridium butyricum (var. butylicum) pour celles produisant du butanol et de l'isopropanol. D'autres souches productrices de solvants non citées ont été décrites. C'est le cas de Clostridium roseum qui est en fait une souche de Clostridium felsineum (GOTTSCHALK et al., 1981) et de Clostridium rubrum qui appartient à l'espèce Clostridium beijerinckii, ces deux souches étant homologues génétiquement (CUMMINS et JOHNSON, 1971).



**TABEAU II a** : Solvants produits par les différentes bactéries du groupe I

	<i>Cl. butyricum</i>	<i>Cl. beijerinckii</i>	<i>Cl. fallax</i>	<i>Cl. pasteurianum</i>	<i>Cl. stichlandii</i>	<i>Cl. tyrobutyricum</i>
Acétone						
Isopropanol						
Propanol						
Butanol	+	+	+	+	+	+
Isobutanol					+	
G + C Z	27-28	26-28	27	26-28	26	28

**TABEAU II b** : Solvants produits par les différentes bactéries du groupe II

	<i>Cl. ghoni</i>	<i>Cl. bifementans</i>	<i>Cl. sordellii</i>	<i>Cl. litusebunense</i>	<i>Cl. subterminale</i>	<i>Cl. sporogines</i>	<i>Cl. plagarum</i>	<i>Cl. acetobutylicum</i>	<i>Cl. avantibutylicum</i>	<i>Cl. perfringens</i>	<i>Cl. felsineum</i>	<i>Cl. chauvoei</i>	<i>Cl. septicum</i>	<i>Cl. difficile</i>
Ethanol				+	+									
Propanol		+				+								
Isopropanol			+	+	+									
Butanol				+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Isobutanol	+	+	+	+	+	+							+	+
Acétone								+						
Hexanol														+
G + C Z	27-28	26	26	26	28	26		28-29	27-28	24-27	26	26-27	21	28

**TABEAU III a** : Caractères distinctifs et sucres fermentés par les bactéries du groupe I (d'après le Bergey's manual)

Légende : + : test positif - : test négatif v : test variable

	<i>Cl. butyricum</i>	<i>Cl. beijerinckii</i>	<i>Cl. fallax</i>	<i>Cl. pasteurianum</i>	<i>Cl. stichlandii</i>	<i>Cl. tyrobutyricum</i>
Maltose	+	+	+	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	-	+
Raffinose	+	+	-	+	-	+
Lactose	+	+	-	-	-	-
Ribose	+	-	v	-	+	-
Amidon	+	-	+	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	v	-	-	-
Nitrate	v	-	-	v	-	-
Arabinose	v	+	-	+	-	-
Cellobiose	+	+	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	-	+
Galactose	+	+	+	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
Inuline	v	+	-	+	-	-
Mélezitose	-	+	-	+	-	-
Mélibiose	+	+	-	-	-	-
Saccharose	+	+	-	+	-	-
Xylose	+	+	+	-	-	+
Cellulose	-	-	-	-	-	-



TABLEAU III b : Caractères distinctifs et sucres fermentés par les bactéries du groupe II (d'après le Bergey's manual)

	<i>Cl. ghoii</i>	<i>Cl. bifementans</i>	<i>Cl. sondellii</i>	<i>Cl. lituseburense</i>	<i>Cl. subterminale</i>	<i>Cl. sporogenes</i>	<i>Cl. flagatum</i>	<i>Cl. acetobutylicum</i>	<i>Cl. avantbutyricum</i>	<i>Cl. perplexans</i>	<i>Cl. felsineum</i>	<i>Cl. chauvoei</i>	<i>Cl. septicum</i>	<i>Cl. difficile</i>
Caséine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lécithinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lyase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	v	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	-	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mélibiose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	v	v	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	v	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : test positif  
 - : test négatif  
 v : test variable

TABLEAU IV : Rendements en solvants de différentes souches saccharolytiques

NOMS DE LA SOUCHE	RENDEMENTS EN SOLVANTS (%)			
	Butanol	Ethanol	Acétone	Isopropanol
<i>Clostridium saccharobutyl acetonium</i>	64		36	
<i>Clostridium saccharo acetobutylicum-beta &amp; gamma</i>	68-73	1-3	26-32	
<i>Clostridium inverti acetobutylicum</i>	66-70	2-3	27-31	
<i>Clostridium saccharo acetobutylicum</i>	68-73	1-3	26-32	
<i>Clostridium saccharo butyl-acetonium Liquefaciens-gamma &amp; delta</i>	60-69	3-4,5	26-35	
<i>Clostridium saccharo aceto perbutylicum</i>	69-76	2-7	18-25	
<i>Clostridium saccharobutylicum gamma</i>	65-80		18-34	1-2
<i>Clostridium visci faciens</i>	66		3	31
<i>Clostridium propylicum</i>	69-70		4-17	14-28
<i>Clostridium propyl butylicum-alpha amylo saccharobutyl</i>	65-70	3-4	5-10	16-20
<i>Clostridium propylicum</i>	65-72	traces	2-4	26-32

RUS  
LILLE

(mélange éthanol - iso-propanol)

Ce sont généralement des germes du sol, de l'eau et de divers végétaux : pommes de terre, topinambours (racines, tubercules) maïs, fèves (graines) (MAC COY et al., 1926 ; WEYER et RETTGER, 1927 ; CALAM, 1980). La plupart des espèces sont mésophiles. Leur optimum de croissance se situe entre 34°C et 37°C (STEEL, 1958 ; BUCHANAN et GIBBONS, 1974). En effet, la température optimale des souches est fonction de l'endroit d'où elles ont été isolées et en particulier de l'altitude, de la température du sol, et de sa nature (MISHUTIN et YEMTSEV, 1973). Ainsi on les trouve plutôt dans les sols à décomposition rapide situés dans les régions chaudes.

La morphologie de C. acetobutylicum est celle d'un Clostridium typique, c'est à dire un bâtonnet allongé ou légèrement courbe, sporulé, isolé ou en paire, long de 3,0 à 7,0 u sur 0,6 - 1,5 u de diamètre. Ils sont Gram positif en culture jeune mais ils peuvent perdre leur coloration en fin de culture. En fait, ce Clostridium présente 3 grands types morphologiques suivant le stade de fermentation (JONES et al., 1982) ; forme végétative ----> forme clostridiale ----> forme sporulée. Une étude de l'ultrastructure de cellules de Clostridium acetobutylicum faite par CHO et DOY (1973) montre la présence d'une paroi multicouche avec une membrane cytoplasmique asymétrique. Entre cette paroi et la membrane cytoplasmique existent des structures tubulaires ou vésiculaires qui ne sont pas présentes chez Clostridium kluyveri. Le système de membranes intracytoplasmiques présent chez Clostridium acetobutylicum est morphologiquement semblable aux mésosomes des bactéries aérobies gram positives. Cependant ces mésosomes peuvent être les résultats d'artefacts de préparations comme cela a été montré par EBERSOLD et al. (1981).

Le pourcentage Guanine + Cytosine (G + C)% ou coefficient de CHARGAFF) se situe autour de 28% chez la plupart de ces bactéries (Tableaux II a et b).

## I - 2. SENSIBILITE A L'OXYGENE

Ces bactéries sont en général anaérobies strictes, mais la tolérance à l'oxygène peut varier suivant les espèces. Si la croissance de cellules de Clostridium acetobutylicum est arrêtée en présence d'oxygène, des expositions de courtes durées (4 à 6 heures) ne sont pas létales.

O'BRIEN et MORRIS (1971) ont suggéré que ce serait plus l'oxygène dans le milieu que le potentiel Rédox qui serait responsable de l'inhibition de la croissance. L'oxygène (40 uM) inhibe la croissance dans un milieu à - 50 mV. Ce potentiel Rédox est maintenu par addition intermittente de dithiothréitol sur milieu de culture aéré. Par contre, dans un milieu anaérobie où le potentiel Rédox est maintenu à + 370 mV par ajout de ferrocyanure de potassium on observe une croissance et un métabolisme normal. Lorsque les conditions anaérobies sont rétablies, les conséquences de l'oxygénation sont rapidement réversibles. La croissance reprend ainsi que la formation de butyrate. Par ailleurs, la dégradation du glucose n'est pas arrêtée pendant la phase aérobie mais seulement ralentie et on a toujours une production d'acétate (Figure N° 1). Selon O'BRIEN et MORRIS, les conditions anaérobies augmenteraient la quantité d'ATP nécessaire aux réactions de maintenance puisqu'elles s'accompagnent d'une baisse du pool d'ATP dans les cellules.



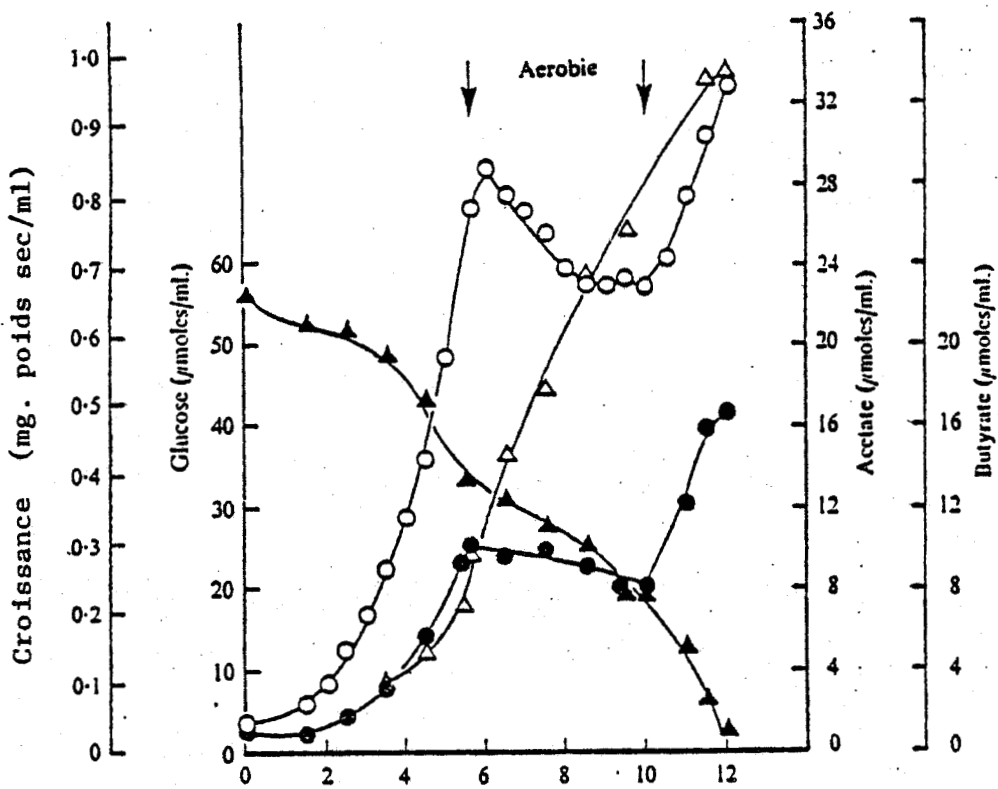


Figure N° 1 : Effets des conditions aérobie sur la croissance et la fermentation de *Clostridium acetobutylicum*

△ Acétate ● Butyrate ▲ Glucose

○ Croissance

(D'après O'BRIEN et MORRIS, 1981)



JONES et al. (1980) montrent que les colonies isolées de Clostridium acetobutylicum, après avoir poussé deux jours en anaérobiose, produisent lors d'une exposition ultérieure à l'oxygène, une substance protéique fibrillaire extracellulaire. Ce manchon protéique contient une haute proportion de cellules sporulées et de spores libres. Cependant, il pourrait jouer le rôle d'une barrière de protection vis à vis de l'oxygène pour les cellules végétatives qu'il contient.

Les spores quant à elles tolèrent l'oxygène et sont thermorésistantes : 10-30 minutes à 80°C ; 4 minutes à 100°C (KAISER, 1982).

### I - 3. NUTRITION

#### a) Substrat carboné

Les souches de Clostridium acetobutylicum poussent bien sur des bouillies de végétaux telles que celles de maïs, de pommes de terre, de topinambour, ainsi que sur mélasses de sucreries (HONG et al., 1981 ; FOUAD et al., 1982) et le lactosérum s'il est additionné d'extrait de levure (MADDOX, 1980). L'aptitude de cette souche à utiliser les pentoses (UNDERKOFFLER et al., 1936 ; LANGLYKKE et al., 1948) est exploitée dans la fermentation des produits résultant de l'hydrolyse des hémicelluloses (MES-HARTREE et al., 1982 ; MADDOX et al., 1983 ; SADDLER et al., 1983). Clostridium acetobutylicum forme une  $\alpha$ -amylase et une glucoamylase. Selon ENSLEY et al. (1975), les deux enzymes dépendent de systèmes de régulation séparés. L'induction de l' $\alpha$ -amylase a lieu quand l'amidon est la source de carbone alors que celle de la glucoamylase se produit pendant la croissance sur glucose. Le

taux de ces deux enzymes est minimal en présence de fructose. Des activités carboxyméthylcellulase (ALLOCK et WOODS, 1981) et même cellulase (COMPERE et GRIFFITH, 1978) ont été trouvées chez cette bactérie ; mais elles sont trop faibles pour envisager l'utilisation directe de cette bactérie sur la cellulose.

#### b) Facteurs de croissance

Sur milieu complexe, la production de solvants est inhibée par un excès en certains composés minéraux tels que le  $\text{Ca CO}_3$ ,  $\text{Fe SO}_4$ ,  $\text{Mg SO}_4$ , et  $\text{Zn SO}_4$  (MAHMOUD et al., 1974). Les phosphates semblent indispensables pour une bonne fermentation des mélasses issues des sucreries (BAGHLAF et al., 1980). Cependant, il est difficile de connaître exactement l'influence de ces différents composés puisqu'il s'agit d'observations faites sur des milieux complexes.

Une étude systématique a été faite par MONOT (1983) sur l'influence de différents constituants d'un milieu synthétique sur la fermentation acétonobutylique afin de déterminer les nutriments nécessaires à une production optimale de solvants. Cela l'a conduit à définir un milieu synthétique permettant de bonnes croissances et production de solvants. La présence des ions Mg, Fe et K est nécessaire à la croissance cellulaire et à la production de solvants.

De faibles teneurs en KCl ne permettent pas à la cellule d'effectuer la phase de solvantogénèse, de même qu'aux faibles concentrations en glucose, seule la fermentation butyrique a lieu. Il montre aussi que la biotine et l'acide para-aminobenzoïque sont indispensables à la croissance de Clostridium acetobutylicum ATCC 824. Ceci confirme les observations faites par OXFORD et al. (1940) et RUBBO et al. (1941) sur

d'autres souches de Clostridium acetobutylicum. Quant à Clostridium butyricum (var. butylicum) il ne nécessite que la présence de biotine (CUMMINS et JOHNSON, 1971).

REYES-THEodoro et al. (1945) ont montré que deux facteurs sont indispensables à trois souches solvantogènes saccharolytiques et non protéolytiques qu'ils ont isolées du sol. Les trois souches ne poussent qu'en présence de biotine ; l'une d'entre elles a également besoin d'acide para-amino-benzofique. Cette observation est en contradiction avec celle du paragraphe précédent puisque la distinction entre Clostridium acetobutylicum (groupe II) et Clostridium butyricum (groupe I) repose entre autre sur la protéolyse. Il convient donc de se méfier a priori de toute tentative de généralisation des besoins en co-facteurs de quelques souches à l'espèce à laquelle elles appartiennent.

### c) Source azotée

Clostridium acetobutylicum utilise l'azote moléculaire, les ions ammonium ainsi que les sources d'azote plus complexes telles que l'extrait de levure et les peptones (ABOU-ZEID et al., 1978).

DOI et SUGAMA (1960), étudiant les sources azotées, ont montré que le glutamate est le seul acide aminé indispensable à la croissance de Clostridium acetobutylicum n° 314. Cependant, l'asparagine, sans être indispensable, a un effet activateur sur la production de solvants (TATUM, 1935).

Un excès d'azote sous forme d'acétate d'ammonium inhibe la solvantogénèse en favorisant la production d'acides (MONOT, 1983).

#### I - 4. BACTERIOCINE

Des auteurs Sud-Africains (BARBER et al., 1979) ont décrit la production d'une bactériocine par Clostridium acetobutylicum P262 dans un procédé de fermentation industriel. Sa libération intervient en fin de croissance exponentielle. Elle est accompagnée d'une lyse des cellules et d'une inhibition de la production de solvants (Figure N° 2 ). WEBSTER et al. (1981) ont purifié et caractérisé cette bactériocine : c'est une autolysine. Elle n'a aucun effet sur la synthèse des acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques ainsi que celle des protéines. Sa structure est celle d'une glycoprotéine avec un poids moléculaire de 28 000 ; thermolabile, elle a son maximum de stabilité entre pH 4 et pH 5. Elle est résistante à l'action de protéases. De plus sa spécificité est très étroite puisqu'elle est limitée aux espèces Clostridium acetobutylicum et Clostridium felsineum. Le gène codant cette autolysine doit être chromosomique car il n'y a pas de plasmides chez cette souche de Clostridium acetobutylicum.

ALLOCK et al. (1981) ont isolé un mutant autolysine déficient (Lyt-1) qui produit moins d'autolysine que la souche initiale Clostridium acetobutylicum P262 et dont la membrane cellulaire est plus résistante. De plus, les cellules végétatives de ce mutant sont plus résistantes au butanol que la souche mère puisqu'à 10 g/l de butanol, la croissance du mutant lyt-1 n'est pas affectée tandis que celle de la souche mère est pratiquement nulle. Ainsi, il existerait une relation entre la tolérance au butanol et l'activité autolytique (VAN DER WESTHUIZEN, 1982).

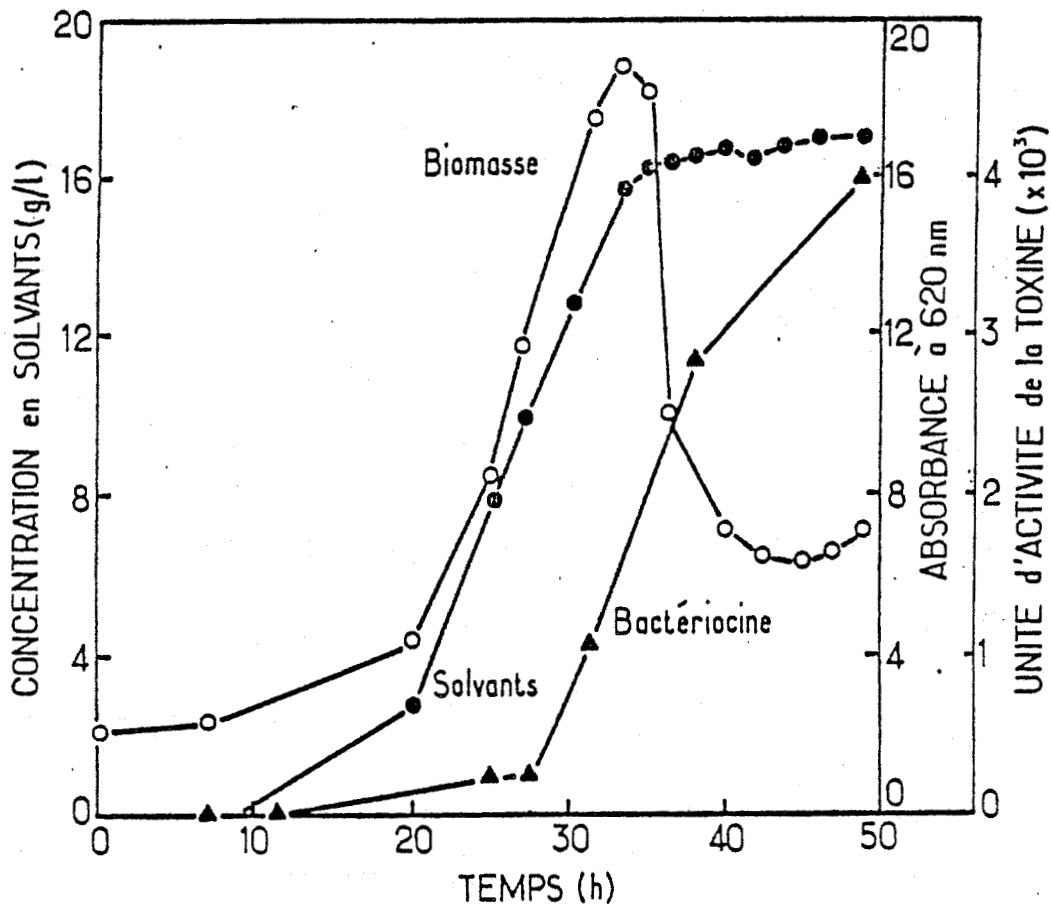


Figure 2 : Evolution au cours du temps de la croissance cellulaire et des productions de solvants et de bactériocine par *Cl. acetobutylicum* (d'après BARBER et al., 1979)





### I - 5. BACTERIOPHAGES

Les bactéries productrices d'acétone et de butanol sont parfois sujettes à la lyse par les bactériophages. Ils sont libérés généralement juste avant le passage de la fermentation acide à la fermentation solvantogène.

A notre connaissance, peu d'études fondamentales sur ces phages existent. Ils ont été mis en évidence lors d'accidents de fermentations (STEEL, 1958 ; ROSS, 1961 ; HASTINGS, 1978). Le seul moyen de lutter contre ces phages est d'utiliser des mutants résistants obtenus par une série de transferts en présence de quantités croissantes de filtrat d'une culture infectée par ces phages (WALTON et MARTIN, 1979). Des mutants résistants ont été isolés par des Japonais (OGATA et HONGO, 1979). Ils ont montré que le développement de l'un de ces phages est réprimé chez un mutant de Clostridium saccharoperbutylicum résistant à l'oxytétracycline lorsqu'on le cultive en présence de cet antibiotique.

### I - 6. TOXICITE DU BUTANOL

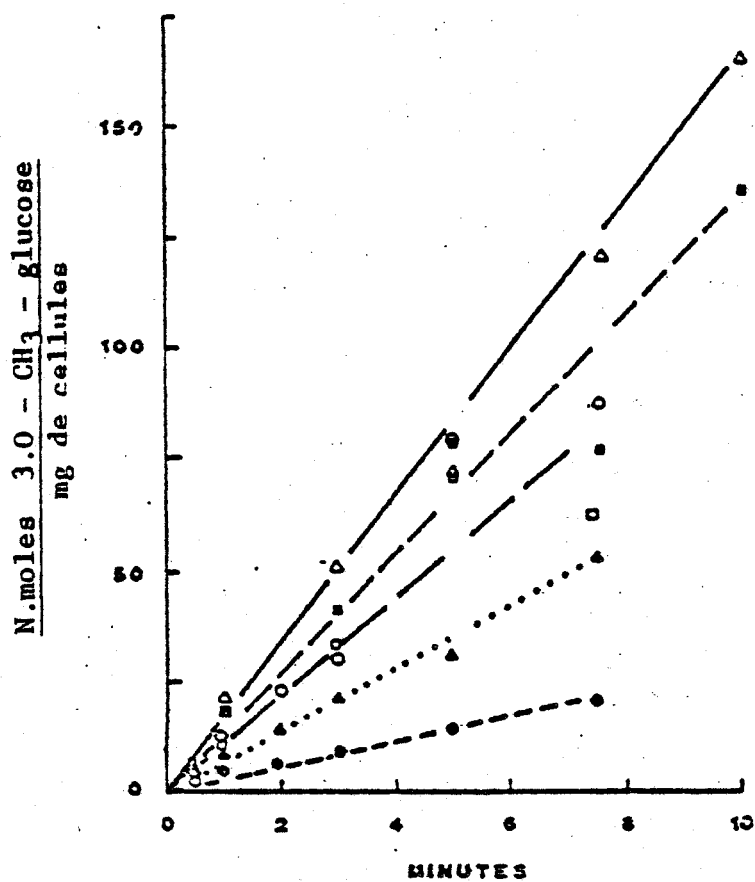
L'un des facteurs limitant la production de solvants est la teneur en butanol dans le milieu. Le maximum de tolérance généralement admis est de 13 g/l.

Chez Clostridium acetobutylicum, 0,15 M (11,1 g/l) de butanol provoque une diminution de 50% du taux de croissance (MOREIRA et al., 1981). La chaîne aliphatique par son caractère hydrophobe altérerait la structure lipidique de la membrane en la fluidisant et affecterait donc l'activité des enzymes membranaires. Cette hypothèse est confirmée par

l'influence de différentes concentrations de butanol sur le transport actif d'un analogue structural non métabolisé du glucose, le 3-O méthyl glucose. En présence de butanol, la vitesse d'incorporation du 3-O méthyl glucose est réduite (Figure N° 3). L'effet des alcools aliphatiques sur la membrane varie en fonction de la longueur de la chaîne carbonée. Ainsi, l'éthanol est environ dix fois moins inhibiteur que le butanol.

Chez de nombreux Clostridia, l'hydrolyse de l'ATP par les ATPases membranaires créerait un gradient de protons qui permettrait l'incorporation des sucres (TUCKEY et OUJESKY, 1976 ; 1978) selon le mécanisme proposé par MITCHELL (1976).

L'inhibition du transport 3-O méthyl glucose par un agent découplant, le dinitrophénol, suggère que le transport des sucres chez les Clostridia dépend lui aussi d'une ATPase (MOREIRA et al., 1981). Cependant, une inhibition directe des ATPases par le butanol n'est pas encore mise en évidence clairement.



**Figure N° 3** : Cinétique d'incorporation du 3-O-méthylglucose en présence de différentes concentrations de butanol

▲ témoin - ■ 0,05 M - ○ 0,07 M - ▲ 0,10 M  
 □ 0,125 M - ● 0,150 M

(d'après MOREIRA et al., 1981)

## II - CINÉTIQUE ET BIOCHIMIE DE LA FERMENTATION ACETONOBUTYLIQUE

### II - 1. FERMENTATION TYPIQUE

#### II - 1.1. Cinétique (Figure N° 4)

Au cours d'une fermentation discontinue sur glucose par Clostridium acetobutylicum, on peut distinguer deux phases (PETERSON et FRED, 1932 ; SPIVEY, 1978). La première est caractérisée par la production d'acides (acétique et butyrique), le dégagement de gaz (hydrogène et gaz carbonique), la croissance des bactéries et la baisse du pH (DAVIES et STEPHENSON, 1941). Après environ 15 heures, la fermentation des sucres produit essentiellement des composés neutres : butanol et acétone (DAVIES, 1942). A ce stade, le pH a une valeur d'environ 4,5. Une partie des acides présents dans le milieu peut être prélevée et convertie en solvants, ce qui se traduit par une remontée du pH jusqu'à une valeur finale de 5,8. Cette réduction des acides exo-cellulaires a été démontrée par WOOD (1945) à l'aide d'éléments marqués. Le moment de passage d'une fermentation à l'autre dépend de plusieurs facteurs : la composition du milieu, le pH, la préparation de l'inoculum (GOTTSCALK et BAHL, 1981).

On peut considérer que ce changement de métabolisme constitue une réaction du micro-organisme à des conditions d'environnement défavorables comme le pH acide. Ainsi, la production de composés neutres agirait comme un mécanisme de "détoxification" des protons (STEEL, 1958). Un pH acide semble une nécessité préalable à la

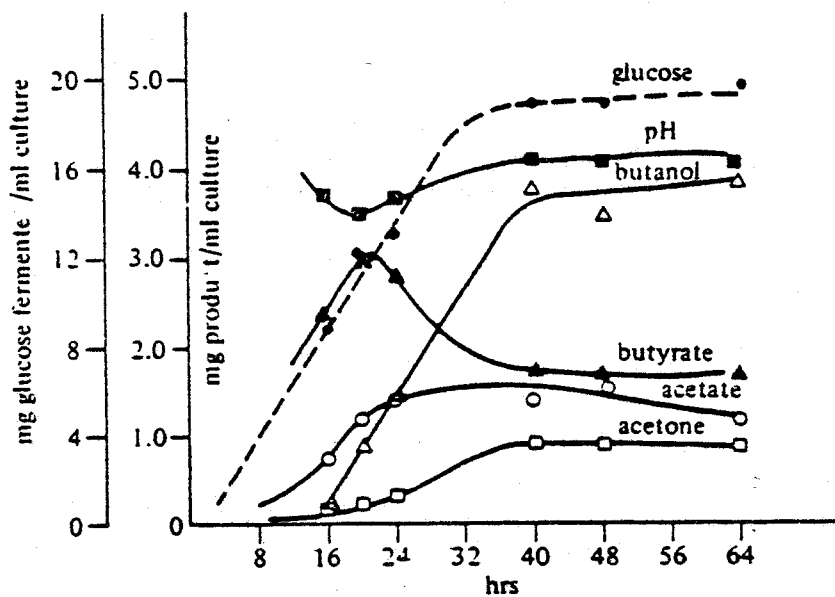


Figure N° 4 : Cinétique de production d'acides et de solvants par *Clostridium acetobutylicum* (d'après DAVIES et STEPHENSON, 1941)



production de solvants (BEESCH, 1952). Cependant, d'autres facteurs physico-chimiques semblent intervenir dans l'induction de la butyraldéhyde déshydrogénase : la concentration du milieu en butyrate et en acétate (GOTTSCHAL et MORRIS, 1981).

II - 1.2. Changement de morphologie de Clostridium acetobutylicum en culture discontinue - Relation entre sporulation et production de solvants

a) Changement morphologique : (Figures N° 5 et 6)

Une étude récente de JONES (1982) met en évidence plusieurs états morphologiques au cours de la fermentation en discontinue sur mélasses de Clostridium acetobutylicum P262. En début de culture, les cellules sont en chaînettes pratiquement immobiles. Pendant la phase exponentielle, les bactéries, sous forme végétative (bâtonnets à bouts arrondis), sont très mobiles et à l'état dispersé. Elles produisent alors des acides acétique et butyrique. Après 18 heures de culture, toutes les cellules sont pratiquement immobiles en phase stationnaire de croissance. C'est à ce stade que démarre la production de solvants conjointement à une modification morphologique qui conduit aux formes "Clostridiales". Les cellules renflées et à extrémités pointues possèdent une capsule bien individualisée et de nombreuses inclusions iodophiles.



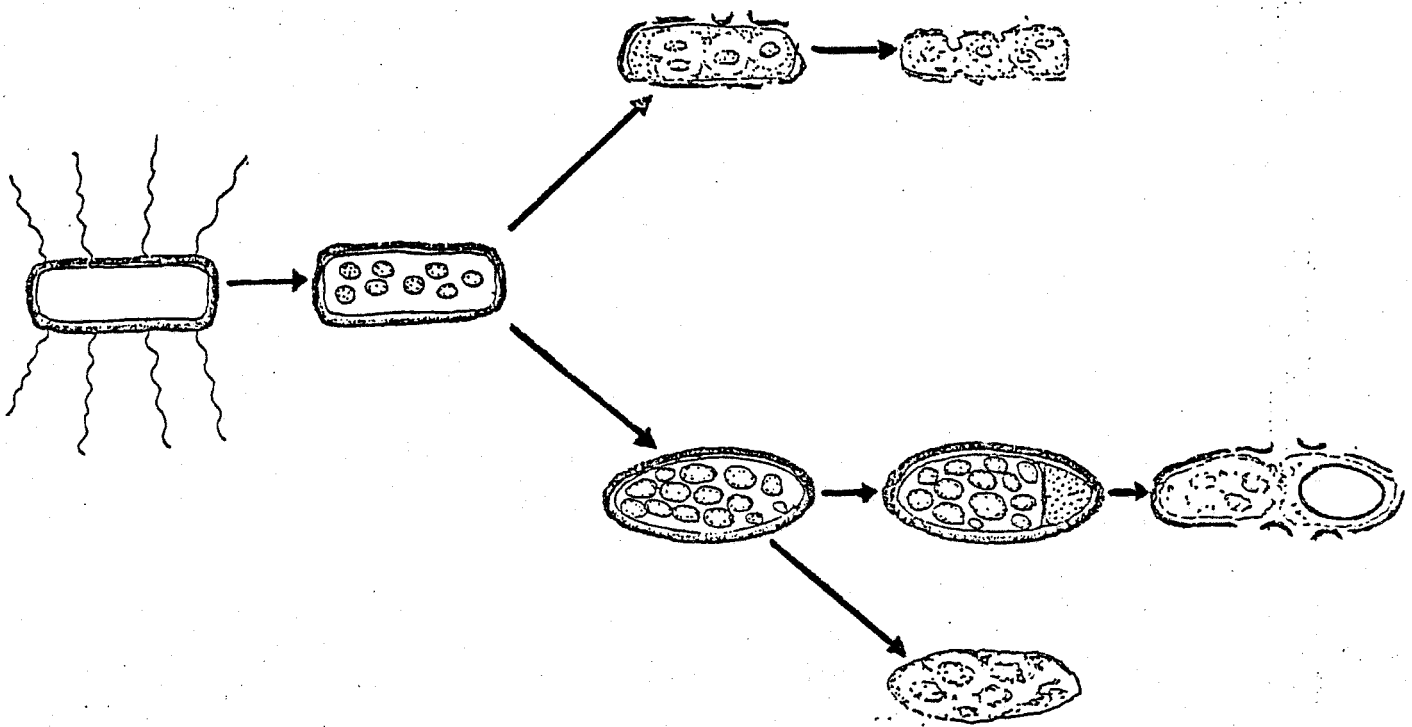


Figure 5 : Différents stades du cycle sporal de  
*Clostridium acetobutylicum*  
 (d'après JONES et al., 1982)

BUS  
LILLE

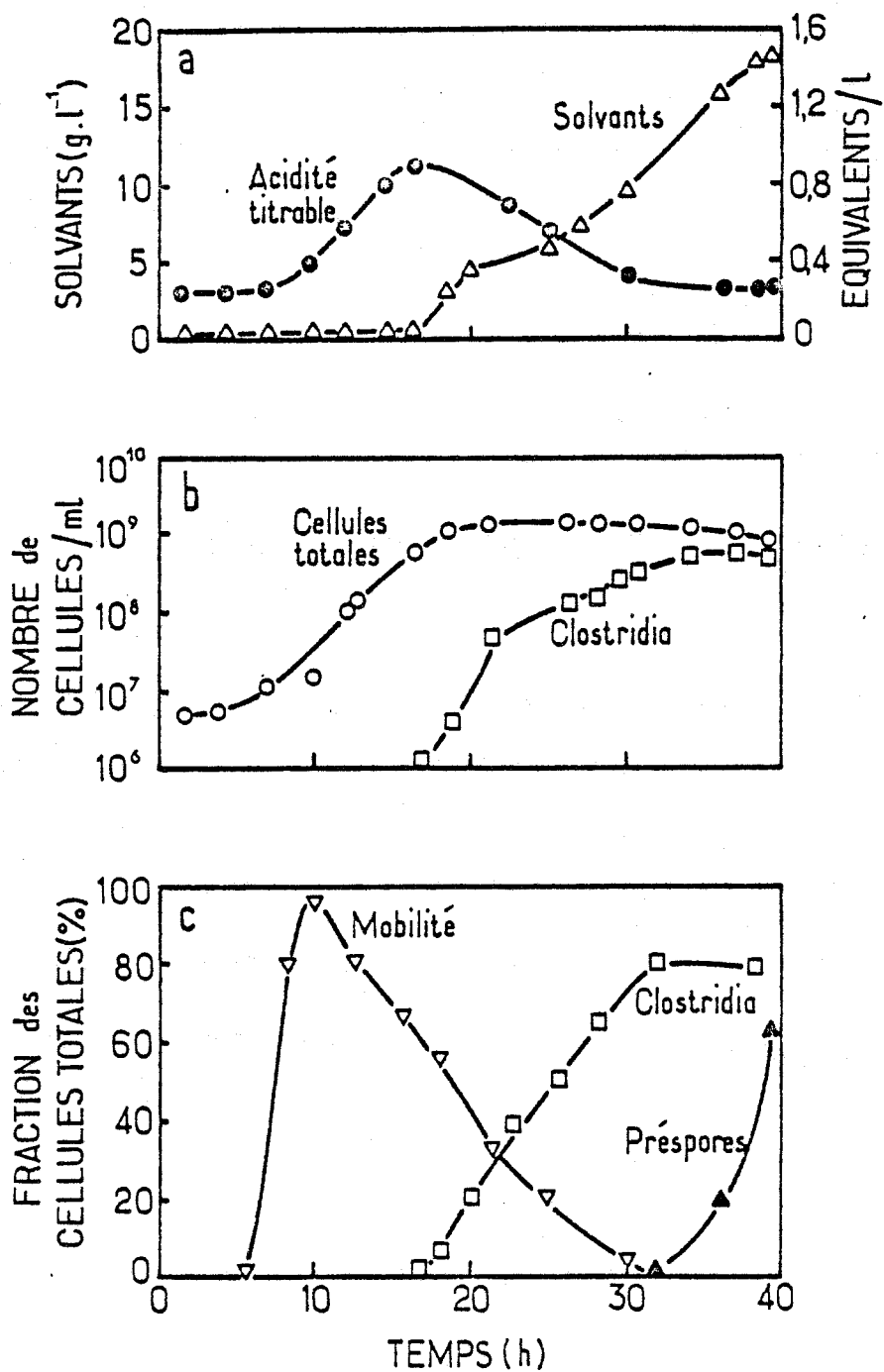


Figure 6 : Changements physiologiques (a), croissance (b) et changements morphologiques (c) de *Cl. acetobutylicum* P262 pendant une fermentation sur MFM (d'après Jones et al., 1982)

b) Relation sporulation-production de solvants

Jusqu'à ces dernières années, on considérait que la production de solvants était corrélée à la sporulation de Clostridium acetobutylicum (PRESCOTT et DUNN, 1954). Cette hypothèse est appuyée par l'apparition simultanée des solvants et de la lyse sporangiale consécutive au processus de sporulation (SEBALD, 1982). De plus, l'inoculation de culture en discontinue à partir de bactéries préalablement sélectionnées en chemostat sous glucose limitant ne s'accompagne plus de la production de solvants (GOTTSCHAL et MORRIS, 1981). La culture en continue dans ces conditions sélectionnerait un mutant incapable de sporuler et de produire des solvants. Mais l'analyse de la liaison sporulation-production de solvants doit être poursuivie. En effet, ANDERSCH et al. (1982) montrent qu'en culture continue sous azote limitant, la production de solvants est possible sans qu'il y ait de spores visibles au microscope.

Selon JONES et Coll. (1982), dans une fermentation industrielle la sporulation débute au bout de 36 heures et ne concerne qu'un nombre limité de cellules. Sur des mutants de sporulation bloqués à différents stades morphologiques (Tableau V), ces auteurs mettent en évidence une corrélation entre l'accumulation de granules iodophiles, le nombre de cellules sous forme clostridiale et la production de solvants. Seuls, les mutants de sporulation bloqués avant la formation d'une préspore mais formant une quantité normale de granules, donnent de bons rendements en solvants.

Il semble donc, à la vue de ces expériences, que la sporulation et la synthèse de solvants ne soient pas directement liées. Toutefois, cela n'exclut pas qu'il y ait entre ces deux phénomènes une induction

Esèce	Formes clostridiales	Granule	capsule	septum	prespore	spore nature	solvants g/l <sup>2</sup>
P262	++	++	++	++	++	++	16,864
cls 1	-	-	-	-	-	-	0,168
cls 2	-	-	-	-	-	-	0,489
cls 3	-	-	-	-	-	-	0,357
cls 4	-	-	-	-	-	-	0,196
Spo 1	++	++	++	+	-	-	16,125
Spo 2	++	++	++	+	-	-	15,411
Spo 3	+	+	+	+	+	+	1,077
Spo 4	+	+	+	+	+	+	2,501

+++ nombre normal

+ nombre faible

- nulle

La production de solvants est déterminée après 48 heures

Tableau V : Caractéristiques de mutants de sporulation de  
*Clostridium acetobutylicum*  
(d'après JONES et al., 1982)

commune. Une étude biochimique des facteurs qui interviennent dans cette transformation pourrait préciser la relation changement morphologique-production de solvants.

## II - 2. INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE

### II - 2.1 Influence des composés du milieu

Les souches de Clostridium acetobutylicum sont capables de métaboliser une grande variété de substrats (MAC COY et al., 1926 ; PRESCOTT, 1959) et selon sa nature et les conditions de culture, les métabolites produits seront différents (FOUAD, 1976 ; COMPERE et GRIFFITH, 1979). Ainsi, par exemple, peu d'acétone est produit par la souche Clostridium butylicum NRRL 593 sur xylose.

En fermentation discontinue, suivant la concentration en substrat, la fermentation va s'orienter soit vers un métabolisme de type acide soit vers un métabolisme de type solvant (MONOT, 1983). Il sera nécessaire de se placer à des concentrations en sucres supérieures à 20 g/l pour avoir une bonne solvantogénèse. On peut considérer qu'en deçà de cette concentration, le pH ne baisse pas assez pour que les acides soient convertis en solvants.

L'addition d'acétate d'ammonium à de fortes concentrations ( 3,3 g/l) inhibe la solvantogénèse (MONOT, 1983). Il est difficile dans ce cas de dissocier l'effet inhibiteur que peut avoir l'ion ammonium de celui de l'acétate d'autant que FOUAD (1976) a montré que la production de solvants variaient suivant la base associée à l'ion ammonium.

## II - 2.2 Influence du pH et de la concentration en acides

### a) En culture discontinue

Très peu d'études systématiques existent sur le rôle du pH dans la fermentation acétonobutylique. Des valeurs de pH allant de 4,2 à 5,5 sont données pour la production de solvants (BEESCH, 1952 ; GOTTSCHAL et MORRIS, 1981). Des travaux récents montrent qu'un abaissement du pH permet de passer d'un métabolisme acide à un métabolisme de type solvant (MONOT, 1983). Il a été observé que l'addition d'acétate et de butyrate à un pH suffisamment bas (inférieur ou égal à 5) induisait de façon plus rapide la production de solvants (GOTTSCHAL et MORRIS, 1981 ; MARTIN, 1983). PIMPA (1983) a remarqué que l'addition de butyrate, s'il inhibait momentanément la croissance, par contre augmentait la vitesse de production de butanol.

### b) En culture continue

A pH neutre, Clostridium acetobutylicum ne produit que des acides quel que soit le facteur limitant (source de carbone ou d'azote) (GOTTSCHAL et MORRIS, 1981 ; ANDERSCH et al., 1982 ; BAHL et al., 1982). GOTTSCHALK et al. (1981) et BAHL et al. (1982) ont montré que la production de butanol est possible en culture continue à des pH inférieurs à 5 et qu'elle est maximale à pH 4,3. Une remontée du pH à 5 se traduit par le retour à la fermentation acidogène. Une nouvelle baisse à 4,3 conduit à une fermentation solvantogène. Toutefois, ces auteurs utilisent un milieu de culture qui contient 20 mM de butyrate et 19 mM de glucose. La concentration en butanol obtenue (1,1 mM) indique un très mauvais rendement de conversion du substrat carboné.



Une augmentation croissante de la concentration en butyrate conduit à une élévation de la production de butanol (BAHL et al., 1982). La concentration optimale en butyrate est de 60 mM ; il lui correspond une production de 11 mM de butanol et 5 mM d'acétone à partir de 19 mM de glucose. Il n'a aucun effet si le pH est supérieur à 5. En présence de 19 mM de glucose, l'addition d'acétate dans les mêmes conditions n'a aucun effet sur la production de solvants.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montrent que pour des pH supérieurs à 5,5, les fermentations sont de type "butyrique" tandis qu'à des pH inférieurs à 5,0 elles sont de type "butylique" ; dans ce cas, une partie du butyrate présent dans le milieu peut être réduit en solvant. Le butyrate, pénétrant dans la cellule sous sa forme non ionisée (THAUER et al., 1977) inhiberait la croissance tout en induisant la solvantogénèse. Ceci semble confirmé par les travaux de MONOT (1983) qui note que la solvantogénèse est induite par la forme non dissociée de l'acide butyrique à partir d'une valeur seuil comprise entre 0,6 g/l et 1,9 g/l

### II - 3. ASSIMILATION DES SUCRES

Tout substrat, notamment les sucres, présent dans un milieu de culture doit traverser la membrane pour être métabolisé par la cellule bactérienne. Cette membrane est connue pour être une barrière très sélective pour les composés aussi bien organiques qu'inorganiques. Deux systèmes sont actuellement connus comme étant responsables du transport actif de molécules :

- Transport actif (transport lié à une force proton-motrice)

- Transport par translocation de groupe

On désigne par transport actif, un processus qui tend à réaliser de part et d'autre de la membrane, une distribution de molécules qui s'éloignent de l'état d'équilibre (KEPES, 1978). Ainsi, ce système de transport se fait contre un gradient de concentration et nécessite de l'énergie fournie par le métabolisme cellulaire.

La principale différence entre le système de transport par translocation de groupe et le transport actif proprement dit réside dans la nature du composé relargué dans la cellule.

Dans le cas du transport actif, la molécule qui arrive dans le cytoplasme est la même que celle qui était dans le milieu extracellulaire. Une source d'énergie chimique ou électrique est nécessaire pour l'entrée de ce composé.

Au contraire, dans le système par translocation de groupe, le passage d'un composé au travers de la membrane a lieu de façon concomitante avec une réaction de phosphorylation. On a alors formation d'un dérivé phosphorylé. L'énergie nécessaire dans ce type de transport est fournie par la liaison du PEP.

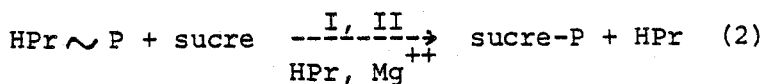
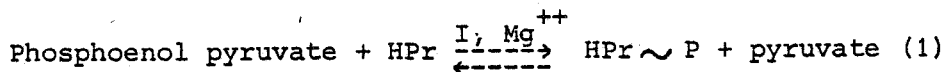
Des systèmes d'accumulation de sucres qui fonctionnent avec l'énergie tirée du PEP sont très répandus dans le règne bactérien. Le système phosphotransférase est très répandu chez les bactéries (SAIER, 1977).

Selon SAIER (1977), les organismes qui métabolisent les sucres par la glycolyse possède la capacité de phosphoryler les sucres par le système phosphotransférase tandis que ceux qui dégradent les sucres en aérobiose via la voie d'Entner-Doudoroff accumule les sucres par un mécanisme de transport actif. Toutefois, dans une même bactérie et pour

un même substrat, il peut exister les deux systèmes : un système phosphotransférase et un système classé "permease" qui fonctionne grâce à "l'état énergisé" de la membrane. Chez les Clostridia saccharolytiques, il est couramment admis que le système prédominant est le système phosphotransférase (DOELLE, 1975).

- Système phosphotransférase

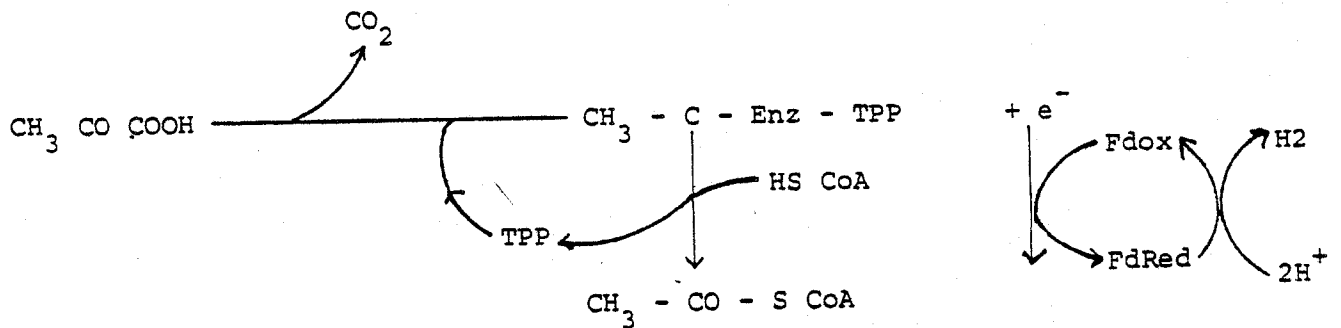
La séquence des réactions ci-dessous rend compte du transport de sucres par ce système :



La réaction (1) est la phosphorylation d'une petite protéine, appelée HPr, par le phosphoenol pyruvate. Cette protéine est thermostable ; le groupement phosphoryle de la protéine est lié à un résidu histidine par une liaison riche en énergie. La phosphorylation d'HPr est catalysée par l'enzyme I, qui, tout comme HPr, est constitutif et soluble. Ce premier complexe, consiste dans le transfert du groupe phosphoryle d'HPr P à un sucre. Le complexe II, membranaire, spécifique du sucre, catalyse ce transfert. C'est ainsi que l'on va avoir toute une classe d'enzymes II, inductibles responsable du transfert du groupe phosphoryle en fonction du sucre. Il existe chez E. COLI jusqu'à 10 paires de protéines spécifiques du sucre.

II - 4. VOIES METABOLIQUES (DOELLE, 1975 ; GOTTSCHALK, 1979 ; REHM et REED, 1981) (Figure N° 7)

La voie empruntée pour le catabolisme des sucres est celle d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS qui conduit au pyruvate. La pyruvate ferredoxine oxydoréductase catalyse la décarboxylation du pyruvate avec libération de  $\text{CO}_2$  et d'acétyl CoA (réaction phosphoroclastique) et transfère des électrons sur une ferredoxine. La ferredoxine réduite ainsi formée est ré-oxydée par une ferredoxine hydrogénase avec libération d'une molécule d'hydrogène. Le détail de ces réactions est résumé dans la figure suivante.



Décarboxylation du pyruvate

L'acétyl CoA est la plaque tournante du métabolisme puisqu'il est au départ de la formation des acides ou des solvants. Une partie de la ferredoxine peut être mobilisée par les NAD(P)H - ferredoxine oxydoréductase (PETIT DEMANGE et al., 1976).

II - 4.1. Formation de l'acétate et du butyrate à partir de  
l'acétyl CoA (Figure N° 8)

la libération d'acétate se fait via l'acétyl phosphate avec synthèse d'une molécule d'ATP lors de l'hydrolyse de la liaison riche en énergie (Figure N°8). Les deux enzymes intervenant sont la phosphotransacétylase et l'acétate kinase.

La formation de butyrate à partir de l'acétyl CoA est un mécanisme cyclique bien connu. La réaction de condensation entre les deux acétyl CoA conduit à l'acéto-acétyl CoA. Ce dernier est transformé en butyryl CoA par deux réductions et une déshydratation. Au niveau de ce cycle, les deux moles de  $\text{NADH}_2$  provenant de la formation du pyruvate sont réoxydées.

Le premier  $\text{NADH}_2$  est réoxydé lors de la réduction de l'acétoacétyl CoA en 3 - hydroxybutyryl CoA par la 3 - hydroxybutyrate déshydrogénase. Une crotonase catalyse la réaction de déshydratation du 3 - hydroxybutyrate en crotonyl CoA. Une déshydrogénase à NAD est responsable de la réduction de ce dernier composé en butyryl CoA. Au cours de cette réaction, une seconde mole de  $\text{NADH}_2$  est réoxydée.

Généralement, la libération du butyrate se fait par transfert du CoA du butyryl CoA sur l'acétate. Cette réaction est catalysée par une CoA-transférerase. Plus rarement, comme dans le cas de l'acétate, le butyrate peut être formé via le butyryl phosphate sous l'action d'une phosphotransbutyrylase et d'une butyrate kinase. Ces deux enzymes ont pu être mis en évidence chez Clostridium butyricum (GAVARD et al., 1957 ; VALENTINE et WOLFE, 1960 ; TWAROG et WOLFE, 1960).

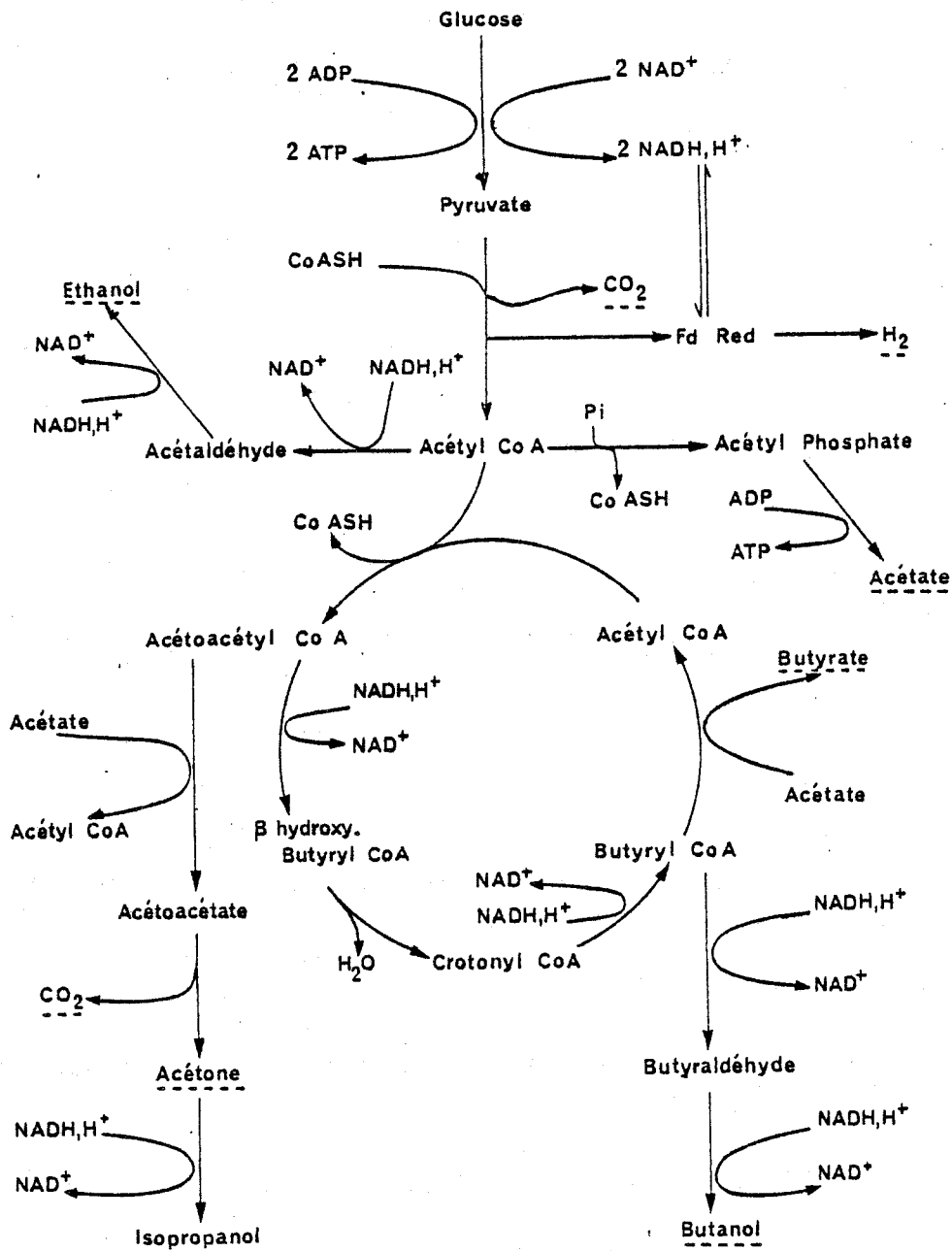
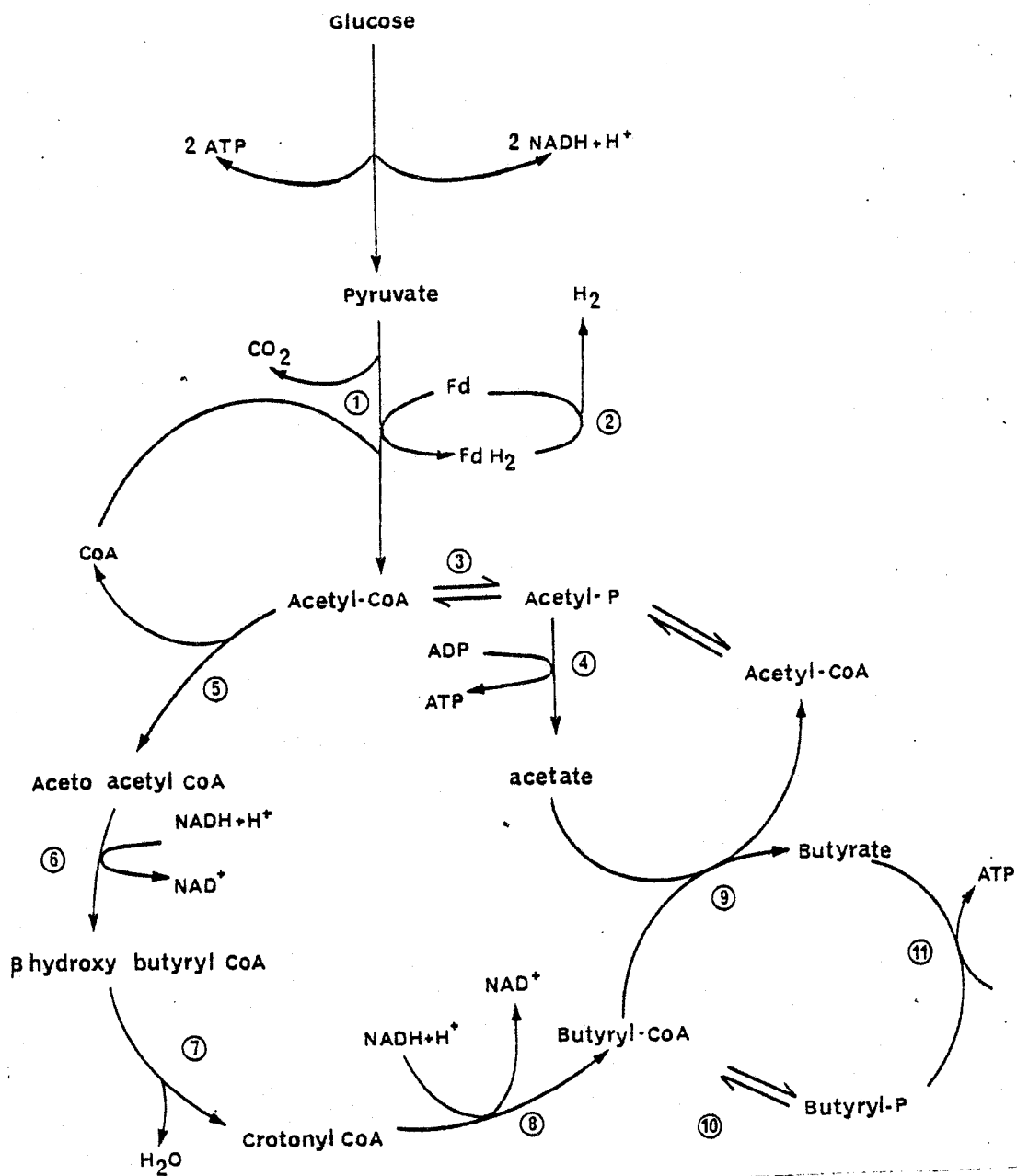


Figure 7 : Voies générales du métabolisme chez les Clostridia





- 1 Pyruvate ferredoxine oxydo réductase (EC. 1.2.7.1)
- 2 Ferredoxine hydrogénase (EC. 1.12.7.1)
- 3 Acétyl CoA : orthophosphate acétyl transférase (EC. 2.3.1.8.)
- 4 ATP : acétate phosphotransférase (EC. 2.7.2.1)
- 5 Acétyl CoA acétyl CoA acétyl transférase (EC. 2.3.1.9)
- 6 3 hydroxybutyrate : NAD oxydo réductase (EC. 1.1.1.30)
- 7 L 3 hydroxy acyl CoA hydrolyase (EC. 4.2.1.17)
- 8 Butyryl CoA : oxydo réductase (EC. 1.3.99.2)
- 9 Butyryl CoA : synthétase (EC. 6.2.1.2. ?)
- 10 Phosphotransbutyrylase
- 11 Butyrate kinase

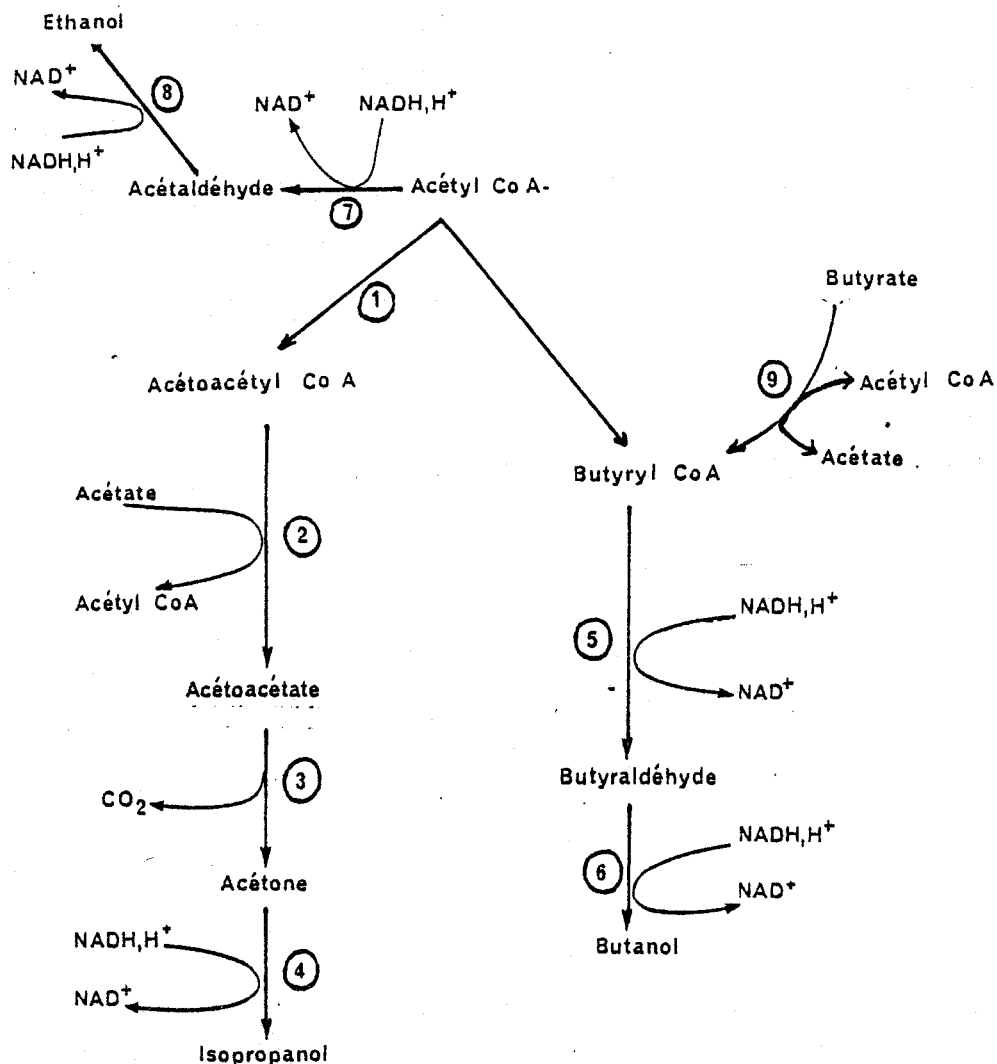
Figure 8 : Formation du butyrate et de l'acetate chez les *Clostridia*

#### II - 4.2. Production d'acétone et d'isopropanol (Figure N° 9)

Clostridium acetobutylicum possède une CoA transférase qui agit sur l'acétoacétyl CoA et qui est caractéristique de cette espèce (DOELLE, 1975). L'acétoacétate produit est décarboxylé en acétone. Cette étape irréversible est réalisée par l'acétoacétate décarboxylase. Cette série de réactions dévie l'acétoacétyl CoA de sa voie métabolique normale : la production de butyrate. L'optimum d'activité des deux enzymes concernés se situe à pH acide. Clostridium butylicum est la seule bactérie capable de réduire l'acétone en isopropanol. Il possède en effet une isopropanol déshydrogénase qui n'agit que sur l'acétone.

#### II - 4.3 Production de butanol et d'éthanol (Figure N° 9)

La production d'acétone s'accompagne d'une baisse de la production de butyryl CoA. La cellule doit donc trouver une voie pour réoxyder les  $\text{NADH}_2$  produits au cours de la glycolyse. Dans ces conditions, le butyryl CoA est réduit en butanol via le butyraldéhyde. L'aldéhyde déshydrogénase NAD-dépendante a une spécificité assez large et agit à la fois sur le butyryl CoA et l'acétyl CoA. L'étape finale est réalisée par une alcool déshydrogénase NAD-dépendante qui agit sur le butyraldéhyde et l'acétaldéhyde. Pour la production de butanol à partir de butyrate exocellulaire, le butyryl CoA est formé soit par le transfert du coenzyme A entre l'acétyl CoA et le butyrate (réaction inverse de la dernière étape du cycle butyrique), soit par condensation de CoA et de butyrate en présence d'ATP si l'acétyl CoA est en quantité faible dans la cellule.



- 1 Aceto acetyl CoA thiolase
- 2 CoA transférase
- 3 Acéto acétate carboxylyase (EC. 4.1.1.4)
- 4 Isopropanol déshydrogénase (EC. 1.1.1.80)
- 5 Butyraldéhyde déshydrogénase
- 6 Butanol déshydrogénase (EC. 1.1.1.1)
- 7 Acétaldéhyde déshydrogénase
- 8 Ethanol déshydrogénase
- 9 CoA transférase (butyryl CoA synthétase ? EC 6.2.1.2)

Figure N° 9 : Formation du butanol, acétone et isopropanol par les *Clostridium*

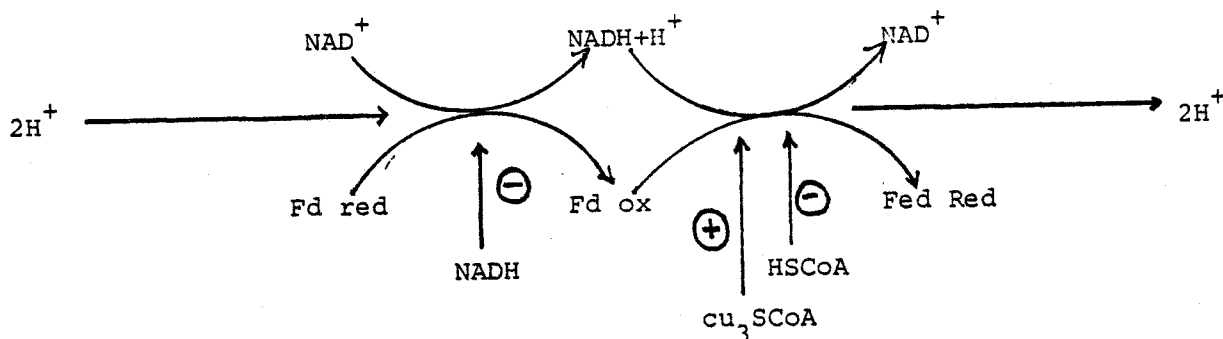


#### II - 4.4 Activités NADH - Ferredoxine oxydoréductasique

L'élucidation de la réaction phosphoraclastique (MORTENSON et al., 1963) laissait prévoir que la fermentation acétono butylique devait dégager autant d'hydrogène que de gaz carbonique. Or, lors de la fermentation acide, la quantité d'hydrogène produite est supérieure à celle qui provient stoechiométriquement de la décarboxylation oxydative du pyruvate. THAUER (1969) a montré chez Clostridium kluveri que la production d'hydrogène à partir de  $\text{NADH}_2$  est possible grâce à une activité NADH-ferredoxine réductasique qui assure le transfert des électrons du NADH sur la ferredoxine. Une activité ferredoxine  $\text{NAD}^+$  réductasique a été également mise en évidence par PETIT DEMANGE (1970) chez d'autres Clostridium du groupe butyrique. En réalité, ces deux activités sont le fait d'une seule enzyme allostérique la NADH ferredoxine oxydoréductase (JUNGERMAN et al., 1975). Outre cette activité, il existe aussi chez Clostridium acetobutylicum, deux autres oxydoréductases qui sont la NAD(P)H-ferredoxine oxydo-réductase (PETIT DEMANGE et al., 1976) et la NADH-rubredoxine oxydo-réductase (PETIT DEMANGE et al., 1979).

La NAD(P)H-ferredoxine oxydo-réductase ayant une activité NAD(P)H-ferredoxine réductasique assez faible, elle sert essentiellement à fournir le NAD(P)H nécessaire aux biosynthèses (JUNGERMANN et al., 1973 ; PETIT DEMANGE et al., 1976). Toutefois son fonctionnement dans la formation de produits réduits peut être envisagée (BEN BASSAT et al., 1981) quant à la NADH-rubredoxine oxydo-réductase, son rôle, sa fonction chez ce Clostridium restent à élucider (PETIT DEMANGE et al., 1981).

Les teneurs intracellulaires en acétyl CoA (JUNGERMAN et al., 1971) et en NADH (PETIT DEMANGE et al., 1971) régulent l'activité de la NADH-ferredoxine oxydoréductase.



L'acétyl CoA intervient comme un activateur allostérique de l'activité NADH-ferredoxine réductasique, il augmente la production d'acides et d'hydrogène moléculaire. Le NADH intracellulaire inhibe l'activité ferredoxine NAD<sup>+</sup> réductasique et oriente la fermentation vers les produits réduits (Butanol, éthanol). Ce mode de régulation de la NADH-ferredoxine oxydo-réductase permet ainsi à la cellule d'effectuer soit un métabolisme de type acide, soit un métabolisme de type solvant.

#### II - 4.5 Métabolisme de type acide (Figure N° 10)

Lors d'une fermentation butyrique, les NADH produits pendant la glycolyse sont entièrement ré-utilisés par le cycle de formation du butyryl CoA.

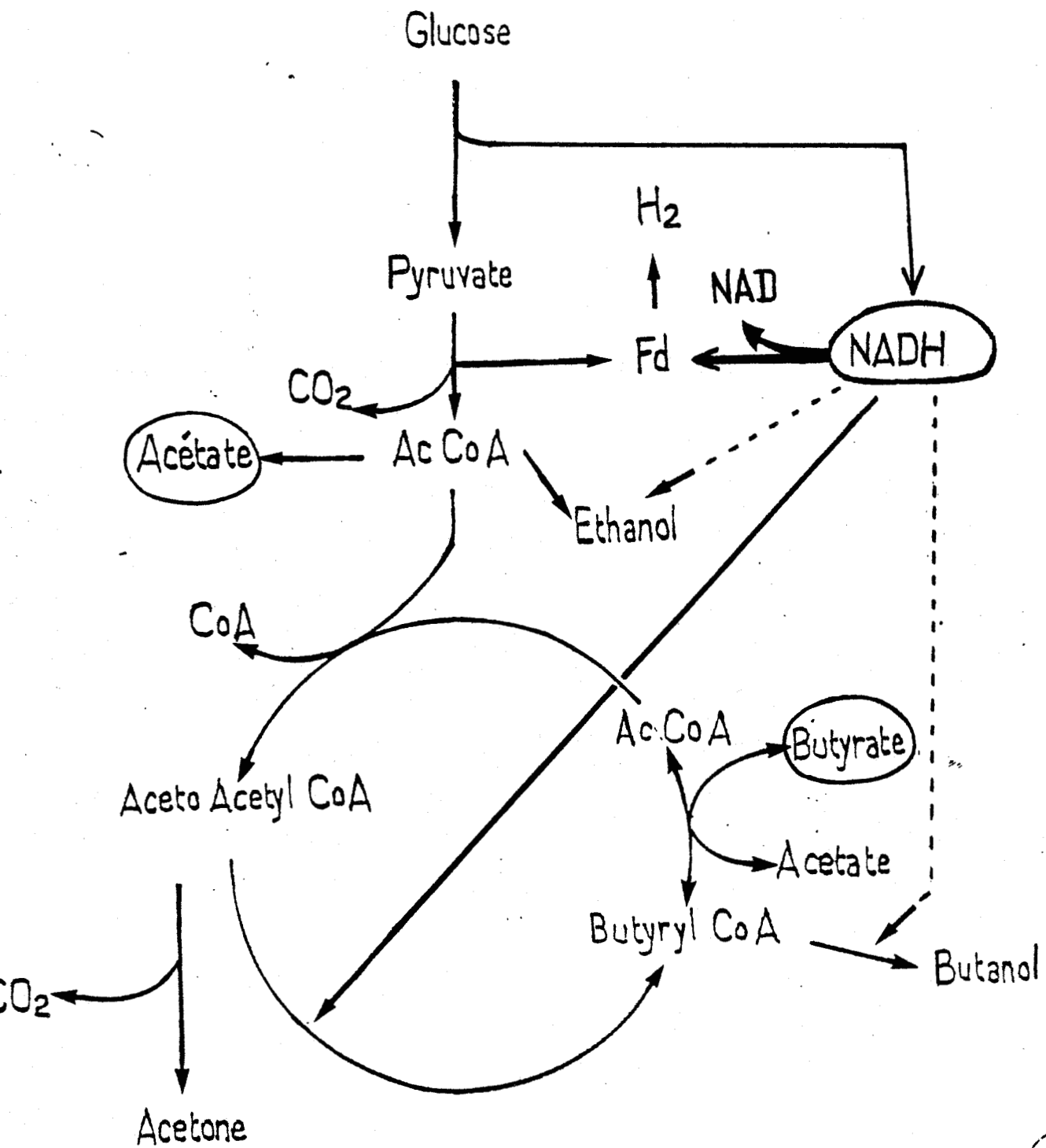


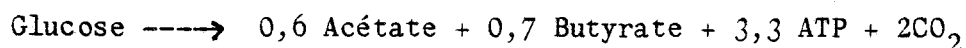
Figure 10 : Metabolisme de type acide



Tous les équivalents réducteurs provenant de la décarboxylation oxydative du pyruvate servent à la réduction de protons et à l'excrétion d'hydrogène. Lorsqu'il y a production d'acétate et de butyrate, la cellule dispose d'un excès de NADH dont l'accumulation est toxique. Le co-enzyme oxydé nécessaire au catabolisme peut être régénéré via les activités NADH-ferredoxine réductasique et hydrogénasique. C'est ainsi que la quantité d'hydrogène produite est supérieure à celle qui provient stoechiométriquement de la décarboxylation oxydative du pyruvate. On a alors un rapport  $H_2/CO_2$  supérieur à 1.

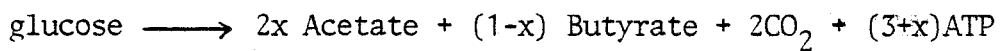
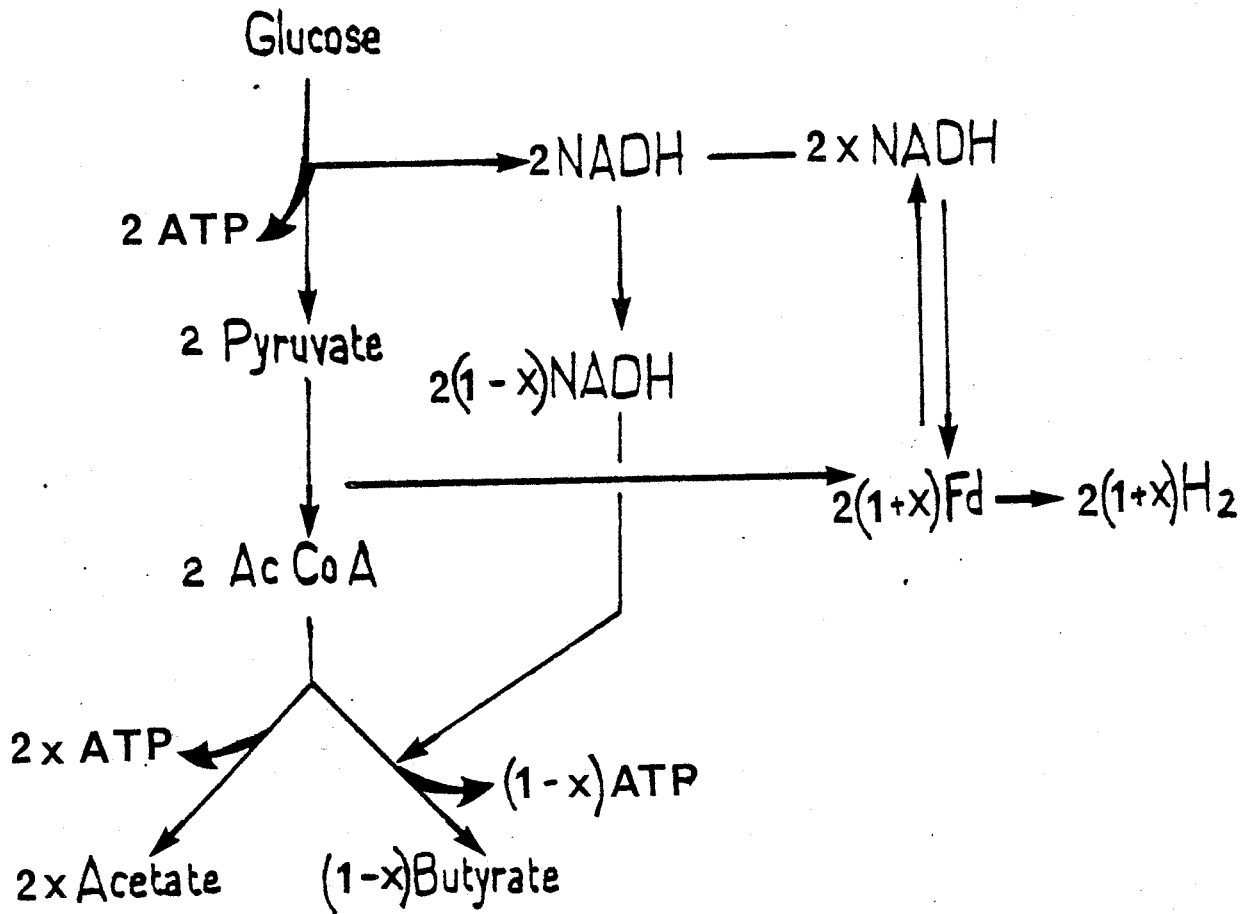
Les coefficients stoechiométriques de la fermentation et le gain en ATP (efficacité thermodynamique de la réaction) vont être déterminés par la quantité  $x$  de NADH mobilisé au niveau de la ferredoxine (Figure N° 11). Cette valeur n'a pas été déterminée pour Clostridium acetobutylicum, mais elle est connue pour Clostridium pasteurianum qui a un métabolisme acide identique à celui de la première phase de fermentation de Clostridium acetobutylicum.

On considère que cette valeur est de l'ordre de 0,3 ce qui conduit au bilan.



#### II - 4.6 Métabolisme de type solvant (Figure N° 12)

Dans le cas de la production de solvants, les besoins métaboliques en NADH sont supérieurs à la quantité fournie par la glycolyse. La NADH-ferredoxine oxydo-réductase par son activité ferredoxine -  $NAD^+$  réductasique va permettre de répondre aux exigences de la cellule en



par exemple pour *Clostridium pasteurianum* la valeur moyenne de  $x$  est de : 0,3  
ce qui conduit au bilan :

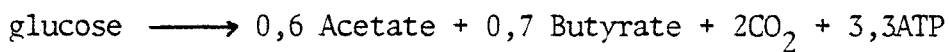


Figure 11 : Regulation du metabolisme chez *Clostridium pasteurianum*



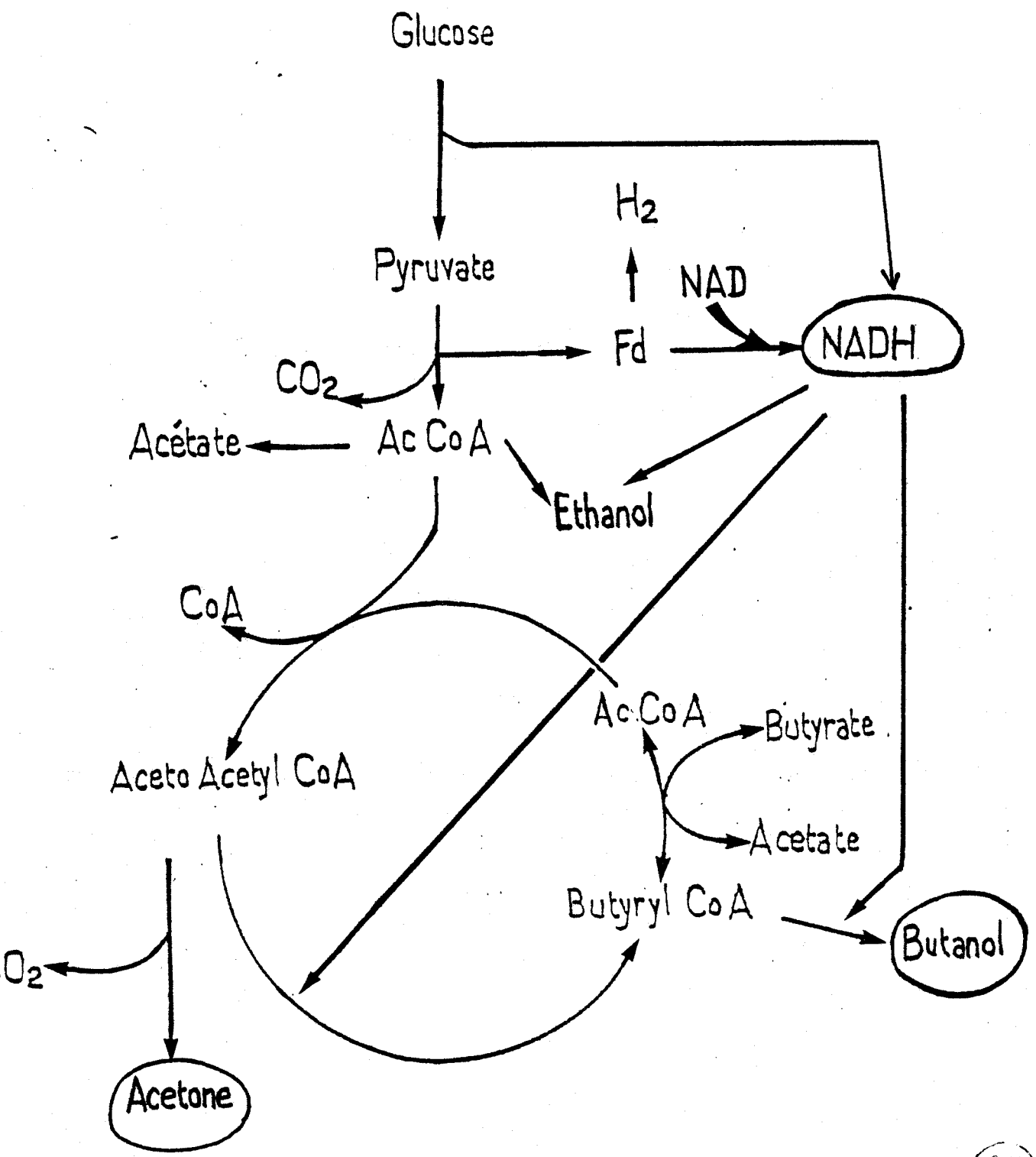


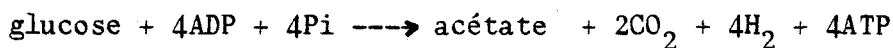
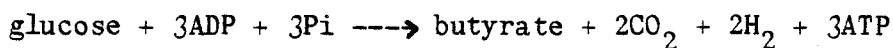
Figure 12 : Metabolisme de type solvant

SUS  
LILLE

fournissant le NADH manquant à partir de la ferredoxine réduite. Cela va se traduire par une diminution de la production d'hydrogène et un rapport  $H_2/CO_2$  inférieur à 1.

#### II - 4.7 Bilan énergétique

Lors de sa croissance, la cellule ayant besoin de beaucoup d'énergie, va emprunter la voie productrice d'acides. Ainsi, pour la production d'acétate et de butyrate, les bilans de fermentation peuvent s'écrire individuellement :



L'activité de la NADH-ferredoxine oxydo-réductase va déterminer le rapport acétate/butyrate et donc le nombre de moles d'ATP. Il sera compris entre 3ATP/mole glucose si on a uniquement formation de butyrate, 4ATP/mole glucose quand le glucose est fermenté uniquement en acétate.

#### II - 4.8 Bilans des équivalents réducteurs

Au maximum de la glycolyse, 200 mM de  $NADH+H^+$  sont produits pour 100 mM de glucose dégradé. Si l'on se base sur les bilans donnés par WOOD (1961) (Tableau VI), on peut déterminer les besoins en  $NADH+H^+$  nécessaires à la formation de chaque produit. C'est ainsi que l'on remarque que Clostridium butyricum a un déficit de 50 mM en  $NADH+H^+$  et que Clostridium acetobutylicum a eu besoin de 60 mM de  $NADH+H^+$  supplémentaires. Par rapport aux 200 mM théoriques, ces différences proviennent des activités ferredoxines oxydo-réductasiques ; dans le cas de Clostridium butyricum (Figure N° 13) ou l'on a uniquement

	mM produits/100mM glucose fermenté		mM NADH nécessaire à la formation de chaque produit:	
	<i>Clostridium</i> <i>butyricum</i>	<i>Clostridium</i> <i>acetobutylicum</i>	<i>Clostridium</i> <i>butyricum</i>	<i>Clostridium</i> <i>acetobutylicum</i>
Butyrate	76	4	152	8
Acétate	42	14		0
Lactate	-	-		
CO <sub>2</sub>	188	221		0
H <sub>2</sub>	235	135		
Ethanol	0	7	28	
Butanol	0	56	224	
Acétone	0	22	0	
			Σ 260	152

Tableau VI: Bilans de fermentation sur glucose chez *Clostridium butyricum* et *clostridium acetobutylicum*

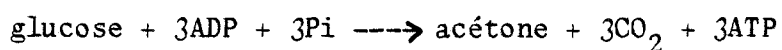
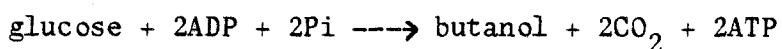
(d'après WOOD, 1961)



production d'acides, l'enzyme fonctionne dans le sens d'une production supplémentaire d'hydrogène (NADH-ferredoxine oxydasique), tandis que dans celui de Clostridium acetobutylicum (Figure N° 14), la NADH-ferredoxine oxydo-réductase par son activité ferredoxine-NAD<sup>+</sup> réductasique va permettre de répondre aux exigences de la cellule en fournissant le NADH manquant à partir de la ferredoxine réduite.

Clostridium acetobutylicum lors de la première phase de fermentation a un métabolisme de type butyrique (comme Clostridium butyricum) pour ensuite passer à un métabolisme de type solvant. Ainsi, on voit que suivant l'avancement de la fermentation, le métabolisme et surtout les activités enzymatiques peuvent fonctionner de façon totalement différente.

La production de solvants conduit à des bilans énergétiques moins favorables à la cellule :



Dans le cas de la production d'acétone, l'ATP supplémentaire est fourni par récupération de l'énergie libérée par l'hydrolyse de la liaison thioester de l'acétoacétyl CoA.

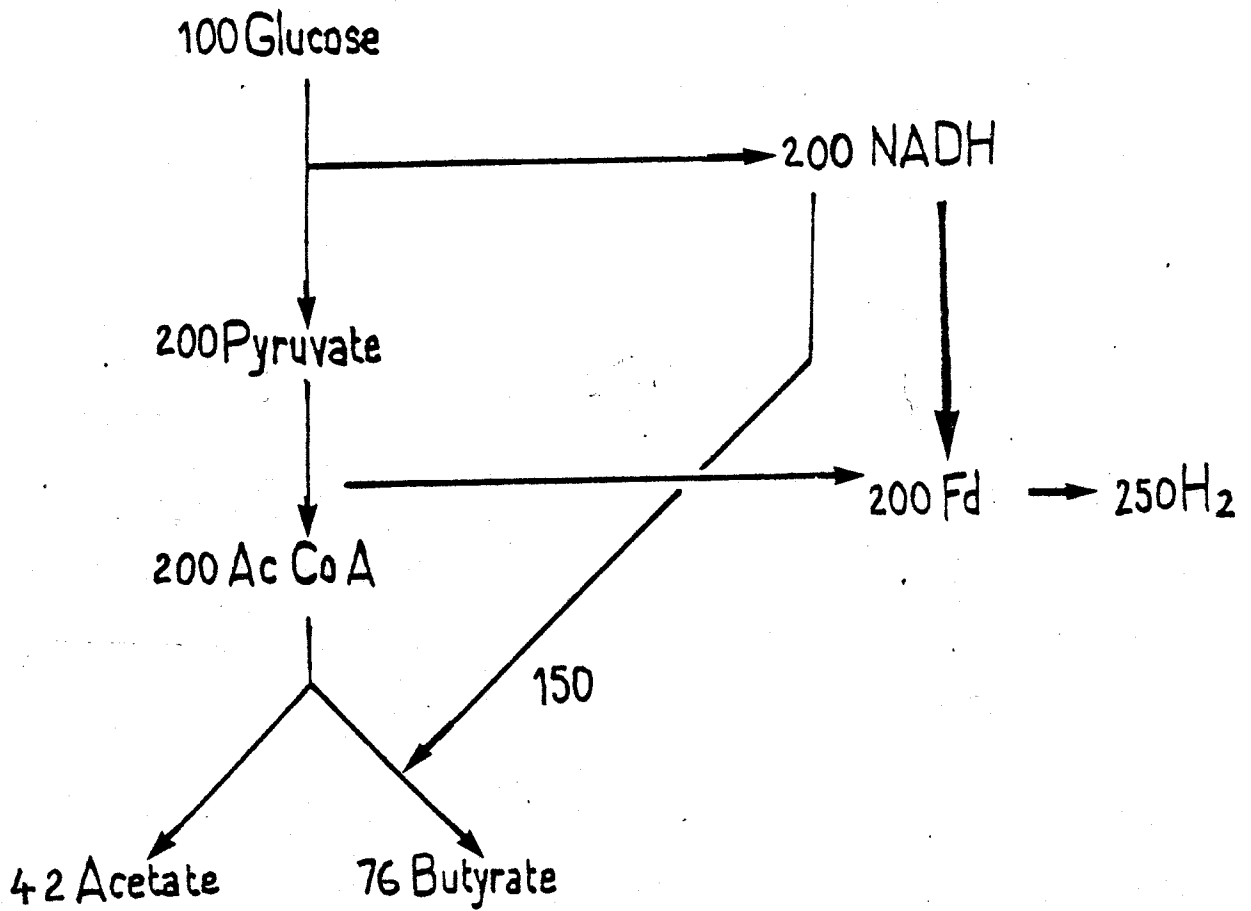


Figure 13 : Bilan NADH d'une fermentation butyrique



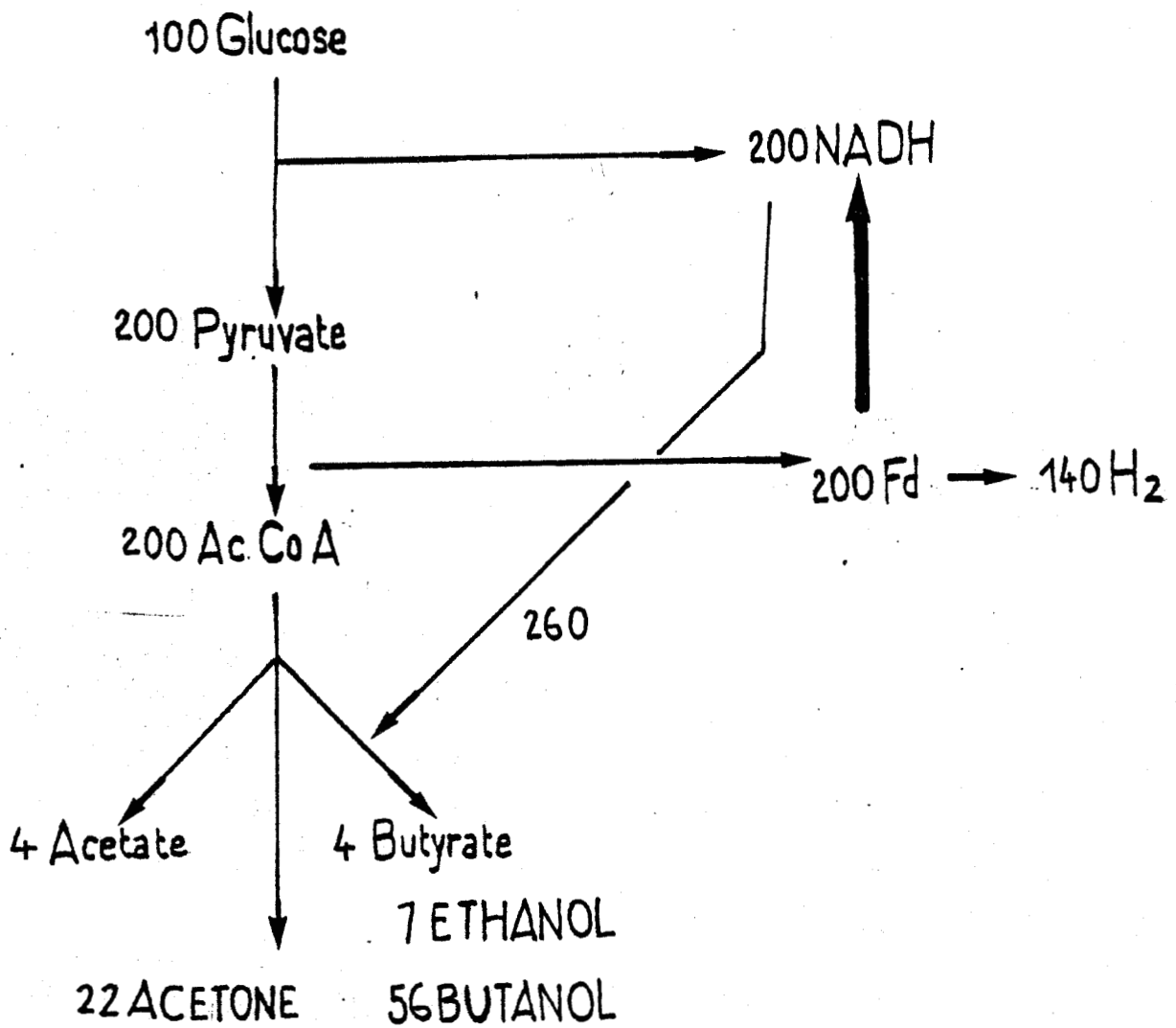


Figure 14 : Bilan NADH d'une fermentation butylique

### III - ASPECTS TECHNOLOGIQUES

La production d'énergie et d'intermédiaires de l'industrie chimique peut s'effectuer à partir de molécules issues de la biomasse et de déchets agro-alimentaires (TONG, 1978, 1979). Dans ce domaine, la fermentation acétonobutylique peut dans certains cas, concurrencer la fermentation méthanique (GOMA et al., 1981). La production industrielle de solvants a fait l'objet de nombreuses mises au point bibliographiques (BEESCH, 1952, 1953 ; VERGNAUD, 1967 ; HASTINGS, 1978 ; SPIVEY, 1978). Les limites actuelles du procédé ont été largement soulignées et discutées. Il ne fait aucun doute qu'une meilleure connaissance de la physiologie des micro-organismes solvantogènes s'impose pour améliorer les performances des procédés industriels.

#### III - 1. UTILISATION DES SUBSTRATS

L'intérêt de Clostridium acetobutylicum réside dans sa capacité d'utilisation d'une grande variété de substrats carbonés glucidiques. Ce sont pour la plupart des sucres en C6 tels que le glucose, le fructose (constituants des mélasses) (POMAR et al., 1977) et surtout les sucres en C5 tels que l'arabinose (MADDOX, 1982), le xylose (constituants des hémicelluloses) (LANGLYKKE et al., 1948 ; NAKHMANOVICK et al., 1959 ; MES-HARTREE et SADDLER, 1982). Les disaccharides comme le saccharose, le lactose et le cellobiose sont

aussi utilisés ainsi que les polymères tels que l'amidon (polymère  $\alpha$  du glucose) et l'inuline (polymère  $\beta$  du fructose) (COMPERE et GRIFFITH, 1978).

Les substrats les plus couramment utilisés pour la production d'acétone-butanol sont les amidons de grains (PETERSON et FRED, 1932) et les mélasses (BEESCH, 1952 ; SPIVEY, 1978).

Plus récemment, la production de solvants a été étudiée sur d'autres substrats comme le lactosérum (MADDOX, 1980), le topinambour (WENDLAND et al., 1941 ; VAN de CASTELLE, 1982) et les hydrolysats d'hémicelluloses (MADDOX et MURRAY, 1983 ; SADDLER et al., 1983).

Dans le contexte agricole national, ont été retenus pour la production industrielle d'acétone et de butanol, deux types de substrats. Les jus de tubercules (topinambours et betteraves semi-fourragères) subissent une hydrolyse acide qui conduit à l'obtention d'un milieu fermentescible en acétone-butanol (Figure N° 15). Le deuxième type de substrat est constitué par les substrats ligno-cellulosiques tels que les tiges de maïs. Leur fermentation en solvants nécessite une hydrolyse préalable plus difficile que celle citée précédemment.

L'hydrolyse enzymatique par les cellulases de Trichoderma reesei a été choisie par l'IFP (Figure N° 16).

Le principal problème posé par l'utilisation des hémicelluloses est la composition en sucres du milieu résultant de l'hydrolyse. On est en présence de mélanges d'hexoses et de pentoses, et la capacité à produire des solvants par Clostridium acetobutylicum varie considérablement suivant le sucre. De plus, les sucres sont moins bien



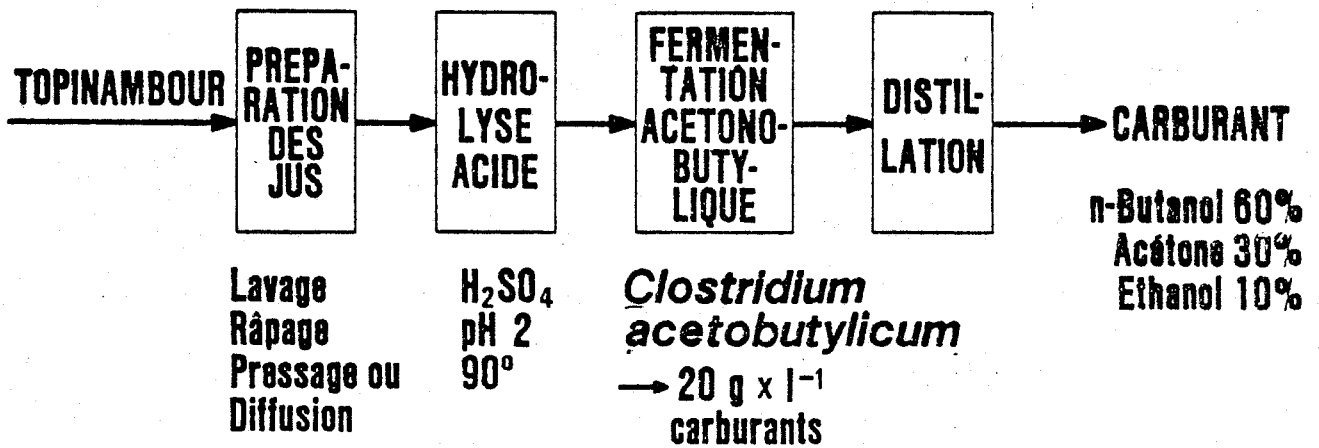


Figure 15. - Fermentation acetonobutylique du topinambour  
 (d'après VANDECASTEELE, 1982)



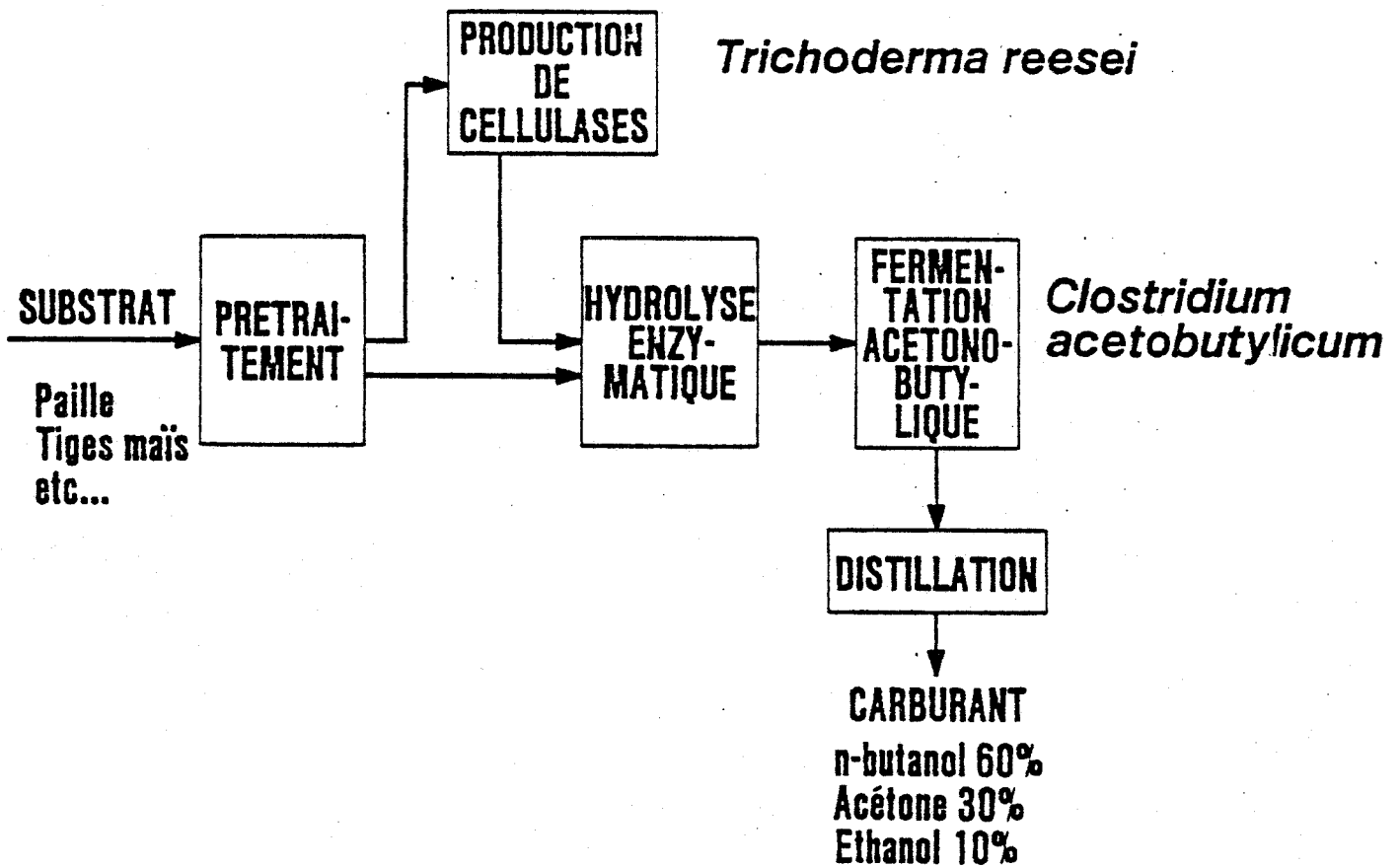


Figure 16 : Fermentation acetonobutylique des substrats celluloseux  
 (d'après VANDECASTEELE, 1982)

fermentés lorsqu'ils sont en mélanges (SADDLER et al., 1983). Enfin, suivant l'hydrolyse utilisée on peut avoir une baisse de la production en solvants due à la présence de molécules inhibitrices.

Pour produire des solvants à partir de matières cellulosiques à faible coût, on peut également envisager l'emploi de co-cultures entre des bactéries cellulolytiques et solvantogènes. En effet, des exemples d'associations symbiotiques stables entre cellulolytiques et productrices d'éthanol ont été décrites. On peut citer la co-culture entre Clostridium thermohydrosulfuricum, bactérie thermophile qui fermente les mono et disaccharides en éthanol et CO<sub>2</sub>, avec une bactérie cellulolytique Clostridium thermocellum qui produit en culture pure, éthanol, acétate, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> et excrète une cellulase active. Leur association conduit à un meilleur rendement de conversion de la cellulose et à une production accrue d'éthanol (Tableau VII). L'amélioration du rendement de conversion du substrat par la co-culture est due à l'élimination des oses et des disaccharides par la bactérie fermentative. Ces oligomères glucidiques sont en effet des inhibiteurs classiques de l'activité des cellulases. Dans le cas de Clostridium acetobutylicum, PETIT DEMANGE et al. (1983) ont montré que la co-culture est possible avec une bactérie cellulolytique. Une plus grande quantité de cellulose est dégradée par la co-culture mais seule la première phase de la fermentation a lieu.

Tableau VII : Produits de la fermentation de la cellulose par *C. thermocellum* en présence et absence de *C. thermohydrosulfuricum* (d'après NG et al., 1981)

Produits (±) après 120 h. d'incubation	<i>C. thermocellum</i> (souche LQRI)	<i>C. thermocellum</i> + <i>C. thermohydrosulfuricum</i> (souche 39 E)
Ethanol	105,3	180,0
Acetate	75,9	8,5
Cellulose dégradée (%) (±±)	60	100

(±) mMol/100 mMol d'équivalent d'anhydro-glucose

(±±) quantité de cellulose initiale 80 mg/10 ml



### III - 2. RENDEMENT

La fermentation acétono-butylique présente un faible rendement de conversion du substrat en solvants (30-33%) et les productions maximales de solvants ne dépassent que très rarement 20 g/l. Ce mélange de solvants obtenu est composé de 60-70% de butanol, 15-40% d'acétone et de l'ordre de 6% d'éthanol. On note que d'importantes quantités de gaz sont produites au cours de cette fermentation, principalement du CO<sub>2</sub>. De nombreux auteurs attribuent au butanol ces faibles performances. A côté de l'amélioration génétique de la résistance de souches, des solutions technologiques sont envisagées. L'extraction actuellement utilisée est la distillation du moût de fermentation. Mais ce procédé est coûteux en énergie. Une étude récente (MADDOX, 1982) montre qu'il est possible de récupérer le butanol en utilisant les silicalites. On peut adsorber jusqu'à 85 mg de butanol par g de silicate. Le procédé d'extraction peut être une alternative intéressante à la distillation d'autant qu'il peut permettre de lever une partie de l'inhibition causée par le butanol. Une autre façon d'augmenter les rendements serait l'utilisation de cellules fixées. Mais ce procédé n'en est qu'au stade expérimental. Cependant, bien que les concentrations obtenues soient encore faibles, elles démontrent la faisabilité du procédé en continu (HÄGGSTRÖM et al., 1980, 1981, 1982).

### III - 3. UTILISATION DES RESIDUS

L'utilisation des vinasses et des gaz permettrait le développement d'une filière intégrée à coût énergétique réduit. En effet, la distillation des moûts fermentés dont la teneur en solvants est de 20 g/l engendrent des quantités importantes de vinasses fortement chargées en matières organiques. Jusqu'à présent, les vinasses sont concentrées, atomisées et utilisées en supplément d'aliments du bétail. Cette poudre contient 30% de protéines et 80 mg/g de riboflavine. Mais la consommation énergétique est importante. Dans ce cas, la fermentation méthanique semble être une filière bien adaptée au couplage dépollution - valorisation énergétique de ce type de résidus. Par ailleurs, les gaz se dégageant lors de la fermentation acétonobutylique semble pouvoir être convertis en méthanol. Ce procédé (procédé CDH de topsee) s'effectue à 250°C-300°C et à basse pression ; un rendement de plus de 90% (basé sur le CO<sub>2</sub>) est obtenu (MOREIRA, 1982). Enfin, il reste à exploiter le procédé à deux étapes, c'est à dire avec séparation de la phase d'acidogenèse de celle de solvantogenèse. Ce concept est actuellement développé chez GOMA à l'I.N.S.A. de TOULOUSE (communication personnelle).

- C H A P I T R E II -

MATERIELS ET METHODES

-§-§-§-§-

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

### I - TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

#### I - 1. TECHNIQUES GENERALES

##### a) Isolement

Les isolements sont réalisés en chambre anaérobie sous atmosphère  $N_2/CO_2/H_2$  (75/15/10) par étalement sur boîte de Pétri. Les milieux sont dans ce cas additionnés de 20 g/l d'agar.

##### b) Culture en flacons pénicilline

L'inoculation et les prélèvements se font à travers des bouchons en butyl, grâce à des seringues stériles. L'élasticité du butyl permet d'effectuer de nombreux prélèvements sans risque d'entrée d'air, ni de contamination. Les bouchons sont flambés à l'alcool avant chaque piquage.



c) Culture en fermenteur

Ces cultures ont été réalisées dans un fermenteur de deux litres équipé d'une régulation de pH par addition de soude 5N. Les prélèvements de milieu sont effectués stérilement à la seringue à travers un septum en butyl. Le volume de milieu est de 1,8 l, il estensemencé par 50 ml de pré-culture.

I - 2. TECHNIQUES DE MUTAGENÈSE

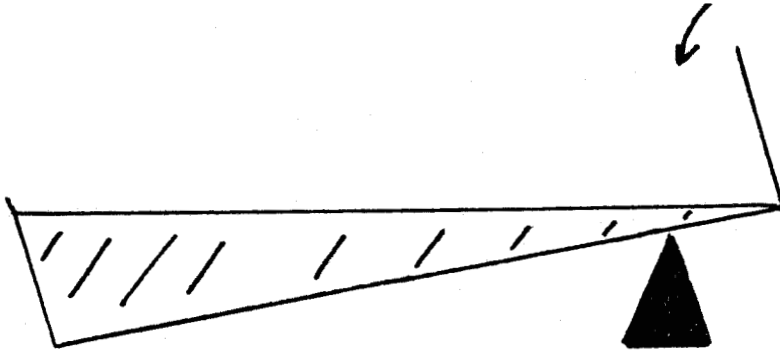
a) Ethyl Méthane Sulfonate (EMS)

A 0,1 ml de culture pris en phase exponentielle, sont ajoutés des quantités croissantes d'EMS (20 ul, 30 ul, 40 ul) et 1 ml de tampon. Après 20 minutes d'incubation à 37°C, 0,1 ml de ces échantillons servent d'inoculum à des milieux CAM contenant des concentrations croissantes de butanol (de 0 à 25 g/l). La croissance est mesurée par turbidimétrie.

b) Gradient en boîte

Cette technique consiste à couler une demie-boîte de Pétri incliné avec de la gélose contenant 30 g/l de butanol (Figure N° 17). La deuxième partie de la boîte est coulée avec une gélose sans butanol. Ainsi on établit entre les bords de la boîte une concentration en butanol allant de 0 à 30 g/l. Théoriquement on a au milieu de la boîte une concentration de 15 g/l de butanol. 1 ml d'une culture en phase exponentielle de croissance est étalé par dissémination sur la boîte. Les souches poussant dans la zone d'inhibition, après avoir été

GELOSE NUTRITIVE A 30 g/l BUTANOL



GELOSE NUTRITIVE SANS BUTANOL

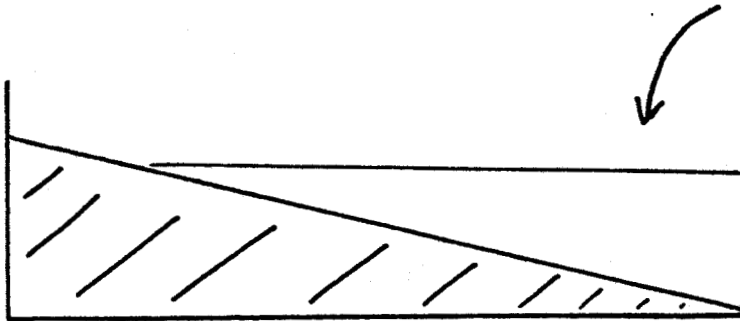


Figure 17: Schema du gradient de butanol

isolées, ont été purifiées. Elles sont ensuite repiquées dans des milieux liquides contenant des concentrations croissantes de butanol. La croissance est mesurée par turbidimétrie.

### 1 - 3. CONDITIONS DE CULTURE

#### 1 - 3.1 Température

La température a été fixée à 35°C pour toutes les cultures sauf lors des cinétiques de croissance en fonction de la température. Les températures sont alors de : 24°C, 27°C, 30°C, 34°C, 37°C, 40°C, 45°C.

#### 1 - 3.2. pH

##### a) Souche solvantogène

Le pH initial des milieux est ajusté à pH 6,1. Le Ca CO<sub>3</sub> à 3,6 g/l évite une baisse du pH en dessous de 5,0. Lors de la cinétique de croissance en fonction du pH, le tampon succinate (55 mM) est utilisé pour les essais avec un pH initial compris entre 4,5 et 5,5 ; le tampon phosphate (68 mM) permet d'ajuster le pH initial du milieu entre 5 et 8.

##### b) Souche cellulolytique

Le pH initial de culture est de 6,7. Lors d'une cinétique de croissance en fonction du pH, le tampon PIPES (50 mM) est utilisé conjointement avec un tampon carbonate. Les pH varient de 5,6 à 7,4.

## II - MILIEU DE CULTURE

### II - 1. MILIEU POMMES DE TERRE

Ce milieu est bien adapté à l'isolement de bactéries amylolytiques et il conduit à une bonne germination des spores.

Sa composition est la suivante :

- Purée de pommes de terre : 250 g
- Glucose 10 g
- Ca CO<sub>3</sub> 2 g
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2 g
- Eau qsp 1 litre

### II - 2. MILIEU CFM MELASSES

Ce milieu est très voisin des milieux utilisés industriellement. Il est utilisé pour tester l'aptitude des souches isolées à la production de solvants. Il correspond au milieu CFM décrit par BARBER et al. (1979).

- Mélasses 134 g
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2 g
- Ca CO<sub>3</sub> 1 g
- Amidon 1 g
- Eau qsp 1 litre

### II - 3. MILIEU SEMI-SYNTHETIQUE

De composition bien définie, il sert à tester la fermentation des substrats carbonés et la croissance des bactéries en fonction des conditions du milieu. Il sera dénommé C.A.M. (sans carbonate de calcium) et C.A.M.C. (avec carbonate de calcium).

Sa composition est la suivante :

- Solution macro-minérale            50 ml
- Solution d'oligo-éléments        10 ml
- Solution de vitamines            5 ml
- Extrait de levure                5 g
- Hydrolysate de caséine           0,5 g
- NH<sub>4</sub> Cl                            0,5 g
- Asparagine                        0,5 g
- Acide para-amino-benzoïque    1 mg
- Ca CO<sub>3</sub>                            3,6 g
- Résazurine (indicateur de potentiel rédox) 1ml

Le pH est ajusté à 6,1.

Les solutions macro-minérales, d'oligo-éléments et de vitamines sont celles décrites par ZEIKUS et al. (1972).

Ce milieu est préparé et réparti selon la technique classique de culture des anaérobies strictes (MILLER et WOLIN, 1973). Avant inoculation, il est réduit par 2% (v/v) de solution cystéine-sulfure. La source de carbone est préparée et stérilisée séparément. Elle est ajoutée au milieu juste avant l'étape de réduction. Sa concentration finale est de 60 g/l.

#### II - 4. MILIEU K2

Ce milieu est utilisé pour la culture de bactéries cellulolytiques.

- Solution macro-minérales 50 ml
- Solution de traces minérales 10 ml
- Solution de vitamines 10 ml
- Extrait de levure 1 g
- $\text{NH}_4 \text{Cl}$  1 g
- Résazurine 1 ml
- Cystéine HCl 0,5 g

On fait bouillir puis on refroidit sous  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (85/15).

Le pH est ajusté à 6,7 par l'addition de  $\text{KHCO}_3$ .

Si la source de carbone est le glucose ou le cellobiose, ils sont rajoutés séparément sous forme concentrée à travers un filtre Millex.

Quant à la cellulose, elle est rajoutée juste avant autoclavage.

#### II - 5. "REINFORCED CLOSTRIDIAL MEDIUM" : RCM

Ce milieu commercialisé par Oxoid, conçu pour les bactéries anaérobies, est utilisé pour la propagation et la conservation des souches.

### III - TECHNIQUES ANALYTIQUES

#### III - 1. DOSAGE DES SUCRES

Les sucres totaux sont dosés par la méthode à l'antrone sulfurique (DREYWOOD modifié par LOEWUS) sur une chaîne à flux continu Technicon.

Les mono- et disaccharides sont dosés au réfractomètre après séparation par chromatographie liquide haute pression (WATERS) sur une colonne Merck Lichrosorb NH<sub>2</sub> (5 m - 3 mm x 25 cm). Les sucres sont élués par un mélange acétonitrile/eau (80/20) à un débit de 1,2 ml/min.

#### III - 2. DOSAGE DES ACIDES GRAS VOLATILS ET DU BUTANOL

Les acides gras volatils et le butanol sont séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Chromatographe VARIAN 3700 muni d'un détecteur à ionisation de flamme (F.I.D.).

- Colonne en inox de 2,5 m x 1/8" remplie de Chromosorb W.A.W 100-120 Mesh imprégné à 25% de NPGA (néopentyl glycol adipate) et 2% d'acide phosphorique.

- Gaz vecteur : azote saturé en acide formique (débit 30 ml/min.)

- Température de colonne : 150°C

- Température de l'injecteur et du détecteur : 170°C

La détermination quantitative des acides gras volatils et du butanol est réalisée par la méthode de l'étalonnage interne. L'étalon interne utilisé est l'acide tri-méthyl-acétique (acide pivalique).

### III - 3. DOSAGE DE L'ACETONE, DE L'ETHANOL ET DE L'ISOPROPANOL

L'acétone, l'éthanol et l'isopropanol sont dosés par chromatographie en phase gazeuse. Les conditions opératoires sont analogues à celles du dosage des acides gras volatils à l'exception de la température de colonne qui est programmée comme suit : d'isotherme à 80°C (5 min.), elle suit une programmation linéaire jusqu'à 160°C (4°C/min).

La détermination quantitative des alcools est réalisée par la méthode de l'étalonnage externe.

### III - 4. DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE

L'acide lactique est dosé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Colonne radial pack C 18 (10 m)
- Eluant : tampon phosphate 0,2 M pH 3, débit 1,2 ml/min.
- Détection en ultra violet à 210 nm.



### III - 5. DOSAGE DES GAZ (HYDROGENE, GAZ CARBONIQUE)

Les gaz sont séparés et dosés par chromatographie gaz-solide. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- Chromatographe PYE UNICAM G.C.D. équipé d'un détecteur à conductivité thermique
- Gaz vecteur azote : débit 45 ml/mn
- Température de colonne : 50°C
- Température d'injection : 60°C
- Température du détecteur : 100°C

### III - 6. MESURE DU VOLUME DE GAZ DEGAGE

Le volume de gaz produit est déterminé grâce à un compteur à impulsion (MOLETTA et ALBAGNAC, 1982).

### III - 7. MESURE DE LA BIOMASSE BACTERIENNE

Elle est réalisée par turbidimétrie à 580 nm en tube de 16 mm de diamètre (résazurine réduite) et à 680 nm lors de cinétique de fermentation (résazurine oxydée).

### III - 8. ESTIMATION DE LA CELLULOSE

La cellulose résiduelle est dosée par filtration sous vide sur Whatman GF/C. Le gâteau est pesé après rinçage à l'acide formique et séchage à l'étuve.

- C H A P I T R E III -

RESULTATS

-§-§-

## CHAPITRE III : RESULTATS

### I - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE SOUCHES SOLVANTOGENES SAUVAGES

#### I - 1. ISOLEMENTS

L'isolement de souches solvantogènes a été réalisée à partir de huit échantillons de sols et de végétaux en décomposition après enrichissement soit sur xylane soit sur amidon (Figure N°18).

##### I - 1.1. Isolement de bactéries xylanolytiques

Nous avons isolé 17 souches xylanolytiques mésophiles. Après 3 cultures d'enrichissement sur milieu CAM contenant 5 g/l de xylane, les isolements ont été réalisés sur milieu gélosé. Un double clônage a été effectué pour s'assurer de la pureté de ces souches. Les souches xylanolytiques ont été classées en 3 groupes suivant leur morphologie et les produits formés :

---

<u>:Groupe:</u>	<u>Nombre de souches</u>	<u>Produits finaux</u>	<u>Morphologie</u>	:
: 1 :	11	: acétate + éthanol	: bacilles gram <sup>-</sup> spore <sup>+</sup> :	:
: 2 :	4	: acétate + butyrate	: bacilles gram <sup>+</sup> spore <sup>+</sup> :	:
: 3 :	2	: acétate	: coques gram <sup>+</sup>	:

---

Toutes les souches en forme de bacille sont sporulées. Deux isolats sont des coques gram<sup>+</sup> qui produisent uniquement de l'acétate. Aucune production de solvants (acétone, butanol) n'a été observée avec ces isolats.

#### I - 1.2. Isolement de souches sporulées amylolytiques

Des milieux pommes de terre ont été inoculés puis soumis à un choc thermique (80°C - 10 mn) de façon à détruire toutes les formes végétatives. Les flacons où la fermentation s'est déroulée le plus rapidement (observé par la cinétique de production de gaz) ont servi à ensemercer des milieux CFM mélasses.

Un premier test fermentaire a été effectué à ce niveau. La présence de butanol a été décelée dans tous les flacons. L'isolement a été réalisé sur milieu gélosé CFM- mélasses par dissémination sur boîte de Pétri. Pour s'assurer de la pureté des cultures, les colonies sont clonées une seconde fois.

A partir de 5 échantillons d'origine différente, 41 souches ont été isolées dont 19 productrices de solvants. Les autres souches effectuaient une fermentation butyrique classique. Parmi les souches solvantogènes, 5 offraient des potentialités intéressantes, c'est à

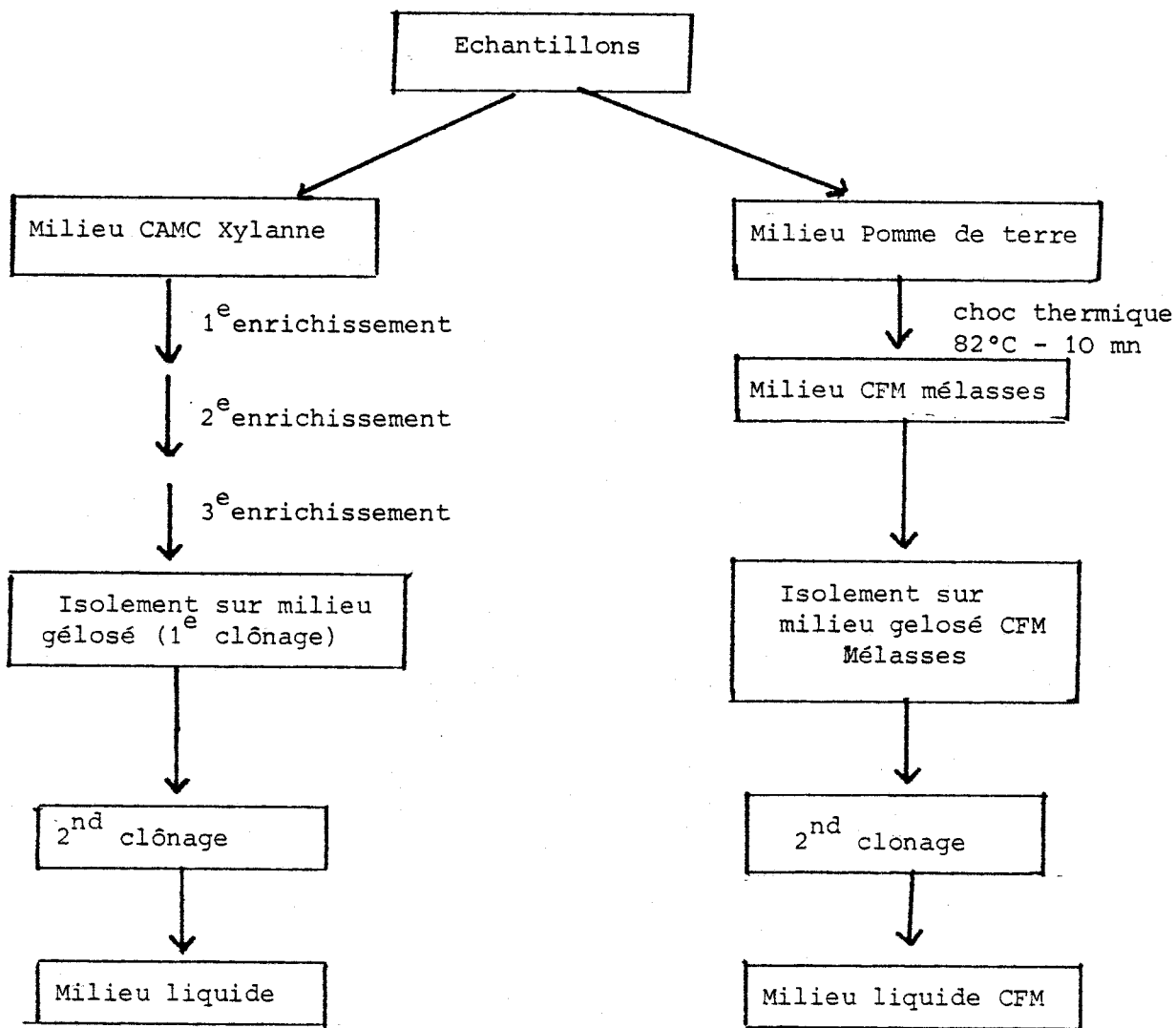


Figure 18 : Schéma d'isolement



dire produisaient des quantités de butanol supérieures à 12 g/l lorsqu'elles étaient cultivées en flacons pénicilline étanches. Elles ont été groupées à l'aide des caractères morphologiques classiques (examen à l'état frais, coloration de Gram) et de tests de fermentation des sucres (galerie API 20A).

## I - 2. CARACTERISATION DES ISOLATS

### I - 2.1. Galerie API 20A

Les isolats ont été comparés à une souche de collection : Clostridium acetobutylicum NCIB 8052. Les galeries sont un moyen commode et rapide pour effectuer un regroupement des isolats. Cependant, leur utilisation pour l'identification des bactéries solvantogènes est assez limitée car les résultats obtenus sont parfois en contradiction avec ceux des manuels de taxonomie (Bergey's manual par exemple). Ainsi, nous avons pu noter avec la souche de référence Clostridium acetobutylicum NCIB 8052 les deux contradictions suivantes :

- cette espèce, classée parmi les protéolytiques, donne un test d'utilisation négatif sur galerie,

- à l'opposé, selon le Bergey's, elle n'utilise pas le cellobiose alors que le résultat de fermentation de ce sucre sur galerie est positif.

On peut cependant distinguer 3 groupes d'importance inégale (Tableau VIII). Les bactéries de ces groupes sont des germes gram+ devenant gram- lorsque la culture est âgée ; leur spore est en position subterminale.



Tableau VIII : Fermentation des sucres par les souches solvantogènes isolées

+ : test positif  
 - : test négatif  
 ± : test variable

Groupe	nbre de souches		
A	3	+	Glucose
B	6	+	Mannose
C	10	±	Lactose
		+	Saccharose
		±	Maltose
		±	Salicine
		-	Xylose
		-	Arabinose
		-	Esculine
		-	Cellobiose
		+	Mannose
		-	Melezitose
		-	Raffinose
		±	Sorbose
		±	Rhamnose
		-	Trehalose
		-	Glycérol
		-	Gelatine



Le groupe C est un groupe hétérogène qui contient uniquement des souches faiblement solvantogènes et qui fermentent très peu de substrats. Ces souches n'ont donc pas retenu notre attention.

Le groupe A est le plus petit groupe ; il ne compte que trois bactéries. Le groupe B en renferme 6. Les bactéries du groupe B se distinguent de celles du groupe A par leur aptitude à fermenter le mélézitose, le raffinose et le glycérol.

Des tests complémentaires seraient nécessaires pour attribuer une place taxonomique précise aux souches des groupes A et B. Toutefois, en se basant sur la fermentation des sucres, il est possible d'identifier le groupe A à l'espèce Clostridium acetobutylicum.

#### I - 2.2. Fermentation des glucides en flacon

A partir d'essais préliminaires de fermentation en flacons sur milieu CFM mélasses, 5 souches ont été retenues en fonction de leur production de solvants, ce sont : dans le groupe A : 8bbA, DLB 6 DBA, DLB 6 DBC et dans le groupe B : 8bbB, 6 x BD.

Pour étudier la production de solvants à partir de différents sucres, nous avons utilisé le milieu de base CAMC. Les performances ont été comparées à celles de la souche Clostridium acetobutylicum NCIB 8052. Les essais sont réalisés en flacons bouchés de 100 ml renfermant 50 ml de milieu à une concentration finale de 60 g de sucre/l. Les productions de solvants sont mesurées après 106 heures d'incubation à 35°C. Quelque soit le substrat, le pH final des cultures variaient entre 4,5 et 5,2.



a) Fermentation du glucose (Tableau IX)

Le pH final des cultures est d'environ 5-5,2. Le glucose n'est utilisé que très partiellement (1/4 à 1/5 de la quantité initiale selon les souches). Quatre souches se distinguent par leur utilisation du glucose et leur production élevée de solvants ; il s'agit de DLB 6 DBA, DLB 6 DBC (groupe A) et 8bbB, 6 x BD (groupe B). Au sein de chaque groupe, les bilans de fermentation du glucose sont pratiquement identiques. Nous avons donc retenu pour la suite des essais les deux bactéries qui paraissaient légèrement plus performantes : DLB 6 DBC (groupe A) et 6 x BD (groupe B). Après 106 heures de fermentation, ces deux bactéries, contrairement aux autres souches testées, produisaient encore du gaz en quantité non négligeable.

b) Autres glucides fermentés (Figure N° 19)

Sur xylose et fructose, ces deux souches se sont révélées plus performantes que la souche témoin. Sur fructose, on observe comparativement à l'essai sur glucose, une solvantogénèse plus importante (c'est essentiellement la production de butanol qui est en augmentation) et, sur xylose, la production totale de solvants est plus faible, mais cela est dû à une production quasi négligeable d'acétone, la production de butanol se maintenant autour de 6 g/l. Sur cellobiose, la production de solvants a été supérieure à celle obtenue sur glucose, la souche 6 x BD ayant un bilan supérieur de 10% aux deux autres souches qui donnent une production de solvants à peu près identique (9 à 9,5 g/l). Sur amidon, la production de solvants était supérieure à celle observée sur glucose. La souche 6 x BD avait un bilan semblable à la souche de référence. La production de solvants obtenue avec la



Souche	Butanol g/l	Acétone g/l	Solvants g/l	Acétate g/l	Butyrate g/l	sucres consommés g/l	pH final
8052	3	1,14	4,14	0,86	0,9	11,7	5,17
8 bba	3,2	0,82	4,02	0,98	1,16	16	4,92
8 bbB	5,5	1,8	7,3	0,46	0,14	19	5,15
6XBD	6	2,12	8,12	0,62	0,3	19	5,36
DLB 6DBA	4,8	1,44	6,24	0,5	0,46	15	5,05
DLB 6DBC	5,4	1,82	7,12	0,86	0,62	14	5,16

Tableau IX : Bilan de fermentation des 6 souches étudiées après 106 heures de fermentation  
(glucose 60 g/l)



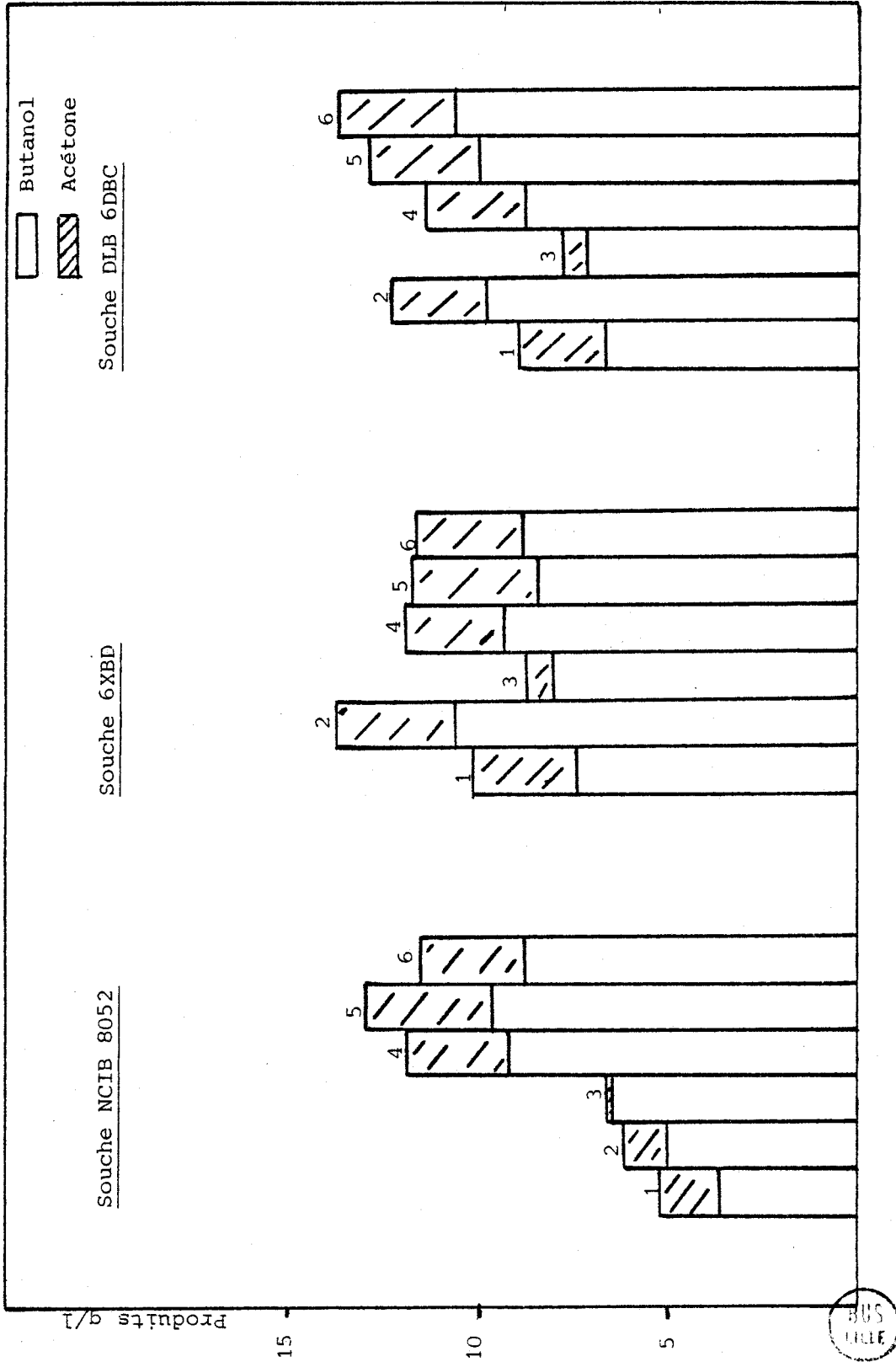


Figure 19 : Fermentation des sucres par les souches NCIB 8052, 6XBD, DLB 6DBC

1, glucose ; 2, fructose ; 3, xylose ; 4, cellobiose ; 5, inuline ;  
6, amidon.

souche DLB 6 DBC était presque de 20% supérieure aux deux autres souches. Dans tous les cas, en concentration, les acides gras volatils résiduels étaient plus faibles que sur monomères. Sur inuline, la souche 6 x BD donne les résultats les plus faibles. La production de DLB 6 DBC est pratiquement la même que celle de la souche de référence (10,4 - 10,5 g/l). La souche 6 x BD utilise mieux le monomère fructose que son polymère à l'inverse de NCIB 8052 qui a une production de solvants deux fois supérieure sur inuline. Cependant, ces résultats sont à interpréter avec prudence, l'inuline ayant été stérilisée par autoclavage.

### I - 2.3. Influence de la température sur le taux de croissance

La température optimale de croissance a été déterminée sur des cultures réalisées sur milieu CAM à 2,5 g/l glucose et incubées 12 heures.

L'ensemble des souches testées est capable de pousser entre 24°C et 37°C (Figures N°20 a et b). Aucune d'entre elles ne pousse à 40°C. Les taux de croissance les plus élevés (situés autour de 0,55 h<sup>-1</sup>) sont obtenus entre 30°C et 37°C avec un maximum à 34°C. Les souches de Clostridium acetobutylicum sont données dans la littérature (BUCHANAN et al., 1974 ; STEEL, 1958) comme ayant une température optimale de croissance à 34°C. Nos essais confirment ici cette observation, la souche 6 x BD a un optimum de croissance ( $\mu_m = 0,52 \text{ h}^{-1}$ ) pratiquement identique à la souche de collection. Le taux de croissance maximal des trois autres souches est un peu plus élevé (0,58 h<sup>-1</sup>).

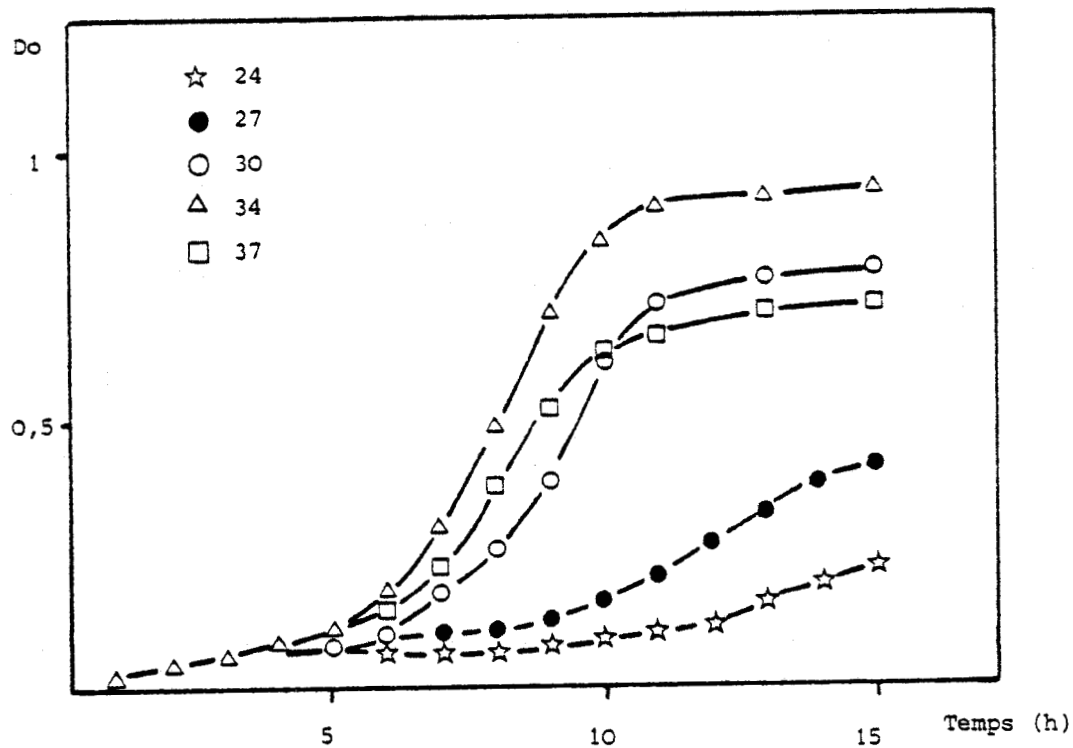


Figure 20a : Cinétique de croissance en fonction du temps à différentes températures par la souche 6 x 3D

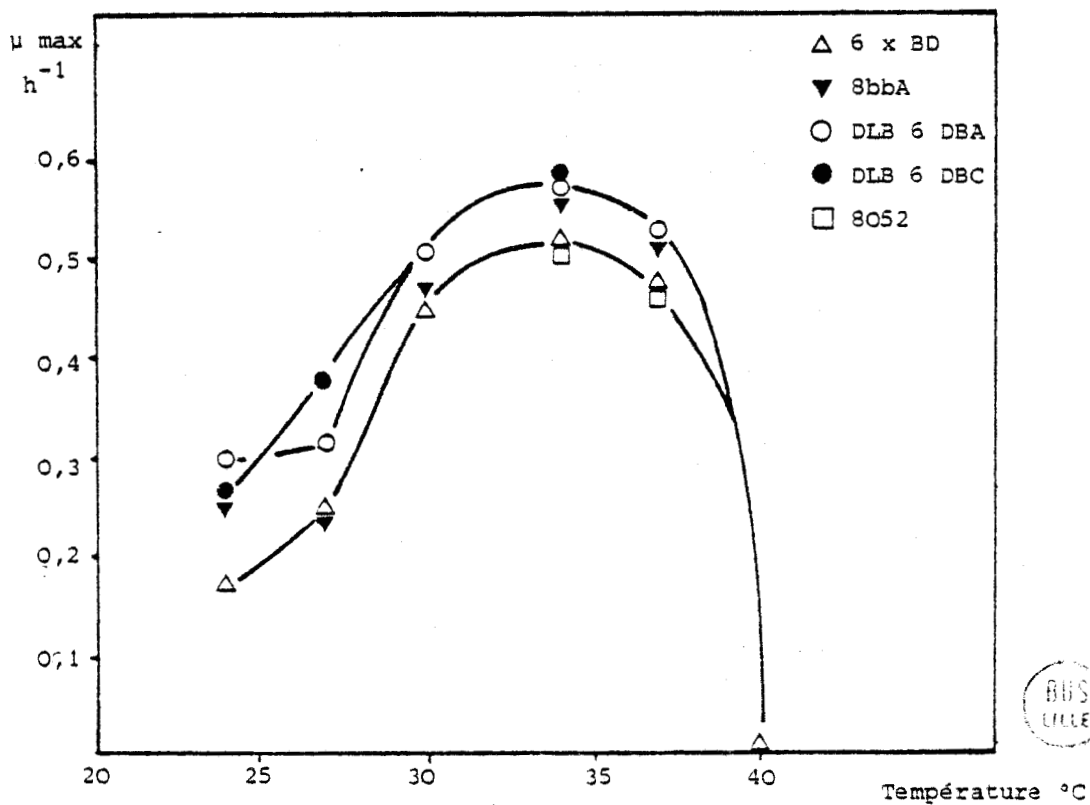


Figure 20b : Taux de croissance maximal en fonction de la température



I - 2.4. Etude du taux de croissance et de la production de solvants en fonction du pH

Nous avons déterminé les taux de croissance pendant la phase exponentielle et la production de solvants des souches NCIB 8052 et 6XBD. Pour cela nous avons utilisé le milieu C.A.M. à 2,5 g/l de glucose à différents pH. Le temps d'incubation est de 12 heures et la température de 35°C. Les taux de croissance maximaux observés sur les 2 souches sont identiques ( $0,52 \text{ h}^{-1}$ ). Mais ils sont situés à des pH différents ; entre pH 6,1 et 6,4 pour la souche NCIB 8052 (Figure N° 21) et entre pH 5,5 et 7,1 pour la souche 6XBD (Figure N° 22). La nature des produits formés varie en fonction du pH initial. Pour des pH supérieurs à 6,4 (6XBD) ou 6 (NCIB 8052) on a essentiellement la formation de butyrate. L'acétate est produit en quantité quasiment constante (0,4 g/l quel que soit le pH). la production de butanol est maximale entre pH 5 et 5,9 pour la souche 6XBD (0,9 g/l) et à pH 5,5 pour la souche NCIB 8052 (0,28 g/l). Dans ces conditions de culture, l'acétone est produit uniquement par la souche 6XBD entre pH 5,4 et 6,4. La souche 6XBD présente un taux de croissance élevé même à pH 5,5 ( $0,48 \text{ h}^{-1}$ ) et produit des quantités notables de solvants même dans ces conditions de culture peu favorables (sucres limitants : 2,5 g/l). Dans les mêmes conditions, la souche de collection possède un taux de croissance beaucoup plus faible et est incapable de fermenter la totalité du substrat.

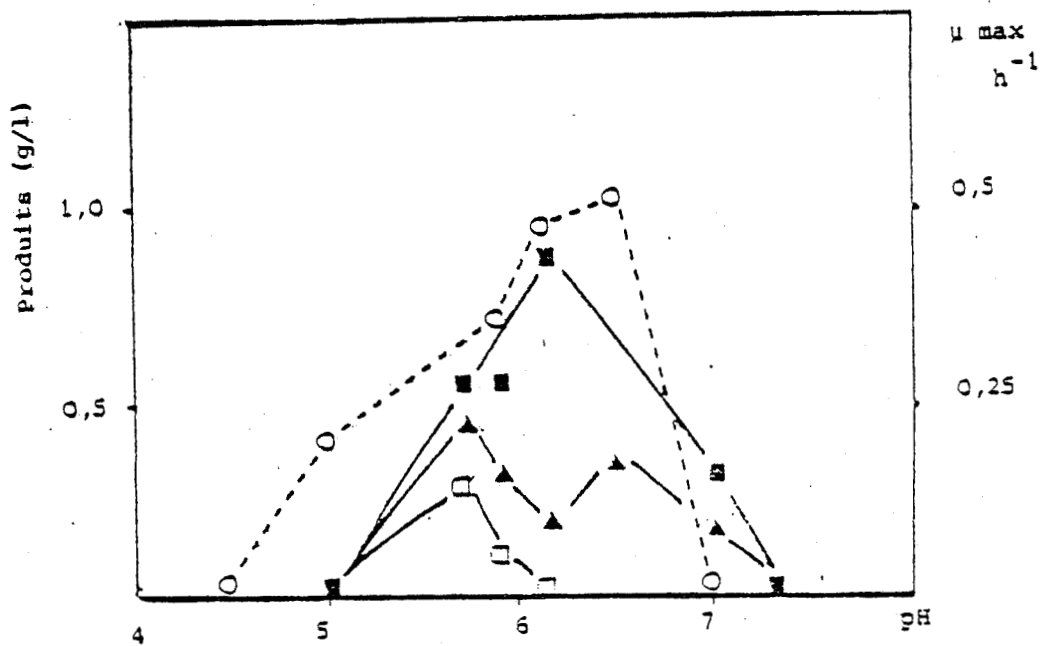


Figure 21 : Produits formés et taux de croissance en fonction du pH chez la souche NCIB 8052

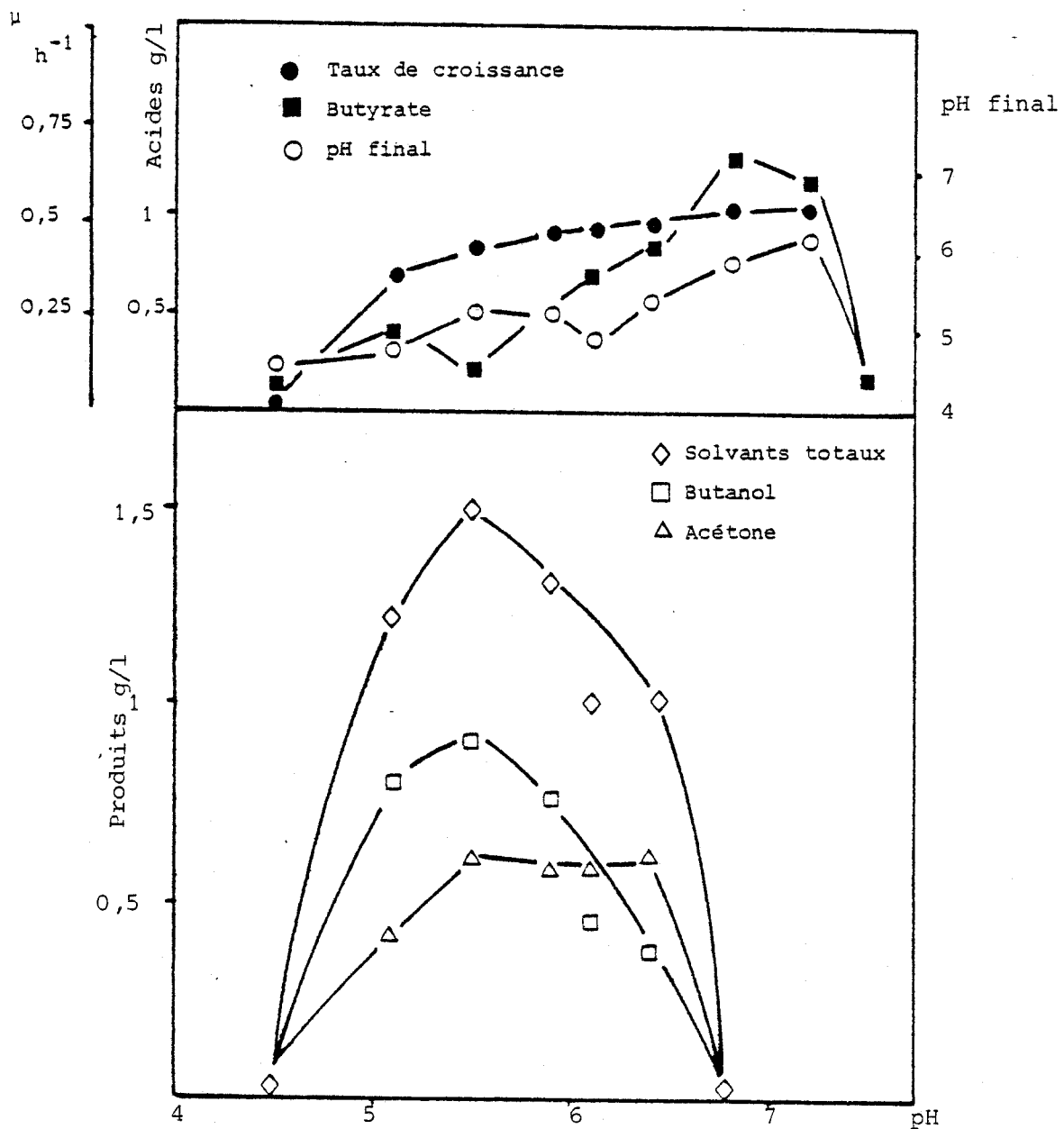


Figure 22 : Influence du pH initial de culture sur le taux de croissance et la production de solvants chez la souche 6 x BD





### I - 2.5. Cinétique de dégradation du glucose

Les performances de la souche 6XBD ont été comparées à celles de la souche de collection après 120 heures d'incubation à 35°C avec une concentration initiale en glucose de 60 g/l, en fermenteur de 2 l sur milieu CAM réglé à pH 5,2 (Na OH 5N).

Les deux cinétiques de dégradation du glucose sont représentées sur les figure N° 23 et N° 24. L'allure des deux cinétiques est semblable. Le taux de croissance est maximal au bout de 10 heures ; il est de 0,65 h<sup>-1</sup> pour la souche NCIB 8052 et de 0,64 h<sup>-1</sup> pour la souche 6XBD. La concentration en acides est maximale au bout de 20 heures, puis on assiste à une baisse du taux de croissance correspondant à la production de solvants. Elle est concomitante à une baisse de la concentration en acides. La production de gaz et la production de solvants cessent après 125 heures. La proportion en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> varie au cours de la fermentation ; de 70% H<sub>2</sub> et 30% CO<sub>2</sub> au départ, elle est de 50% CO<sub>2</sub> et 50% H<sub>2</sub> à 12 heures de fermentation puis se stabilise à 60% CO<sub>2</sub> et 40% H<sub>2</sub> jusqu'à l'arrêt de la fermentation. En fin de culture, la concentration en glucose résiduel est de 14 g/l (6XBD) et 22 g/l (NCIB 8052).

Le fait remarquable dans les deux cinétiques est la correspondance entre la baisse de la concentration en acides et l'accroissement de la production de solvants. Ayant atteint des concentrations situées entre 0,7 g/l et 1 g/l, les acides ne sont plus produits et on assiste à une augmentation de la concentration en solvants. Puis, le ralentissement de la production de solvants s'accompagne d'une reprise de la production d'acides. Ceci se produit jusqu'à la fin de la fermentation. On remarque surtout ce phénomène en suivant l'évolution du butyrate et

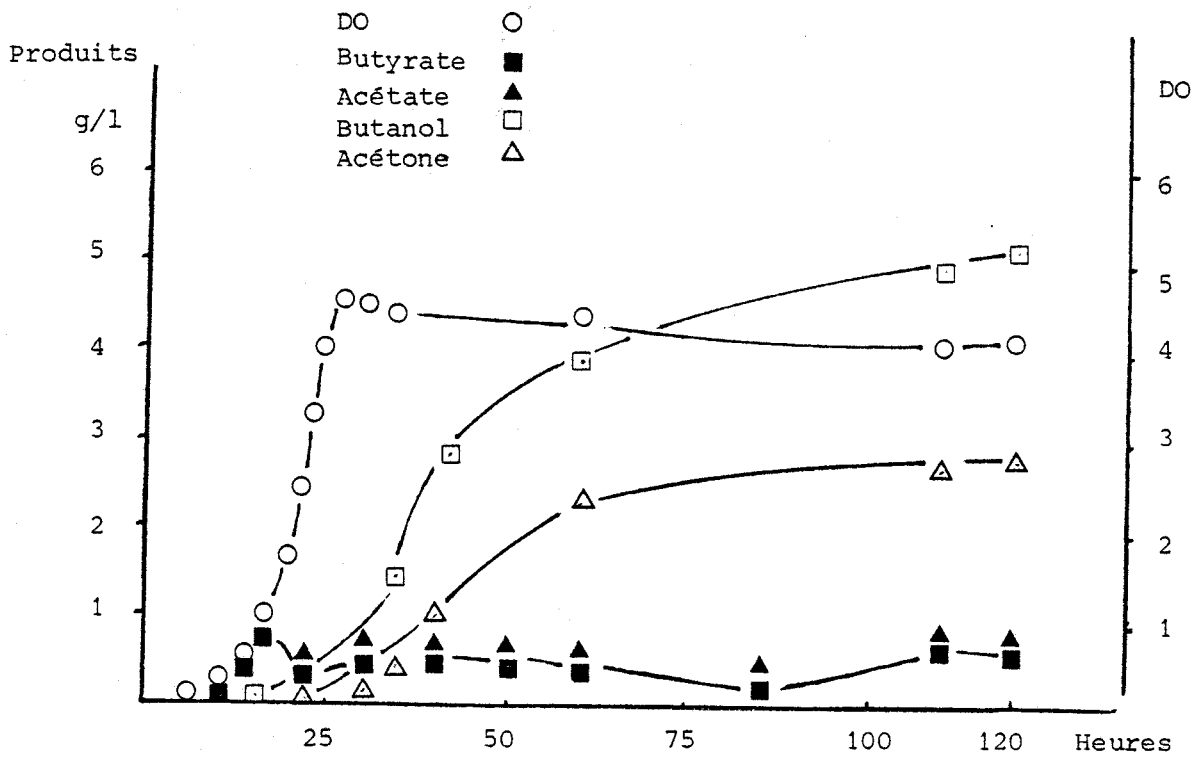


Figure 23 : Cinétique de production d'acides et de solvants pour la souche NCIB 8052 (glucose 60 g/l)

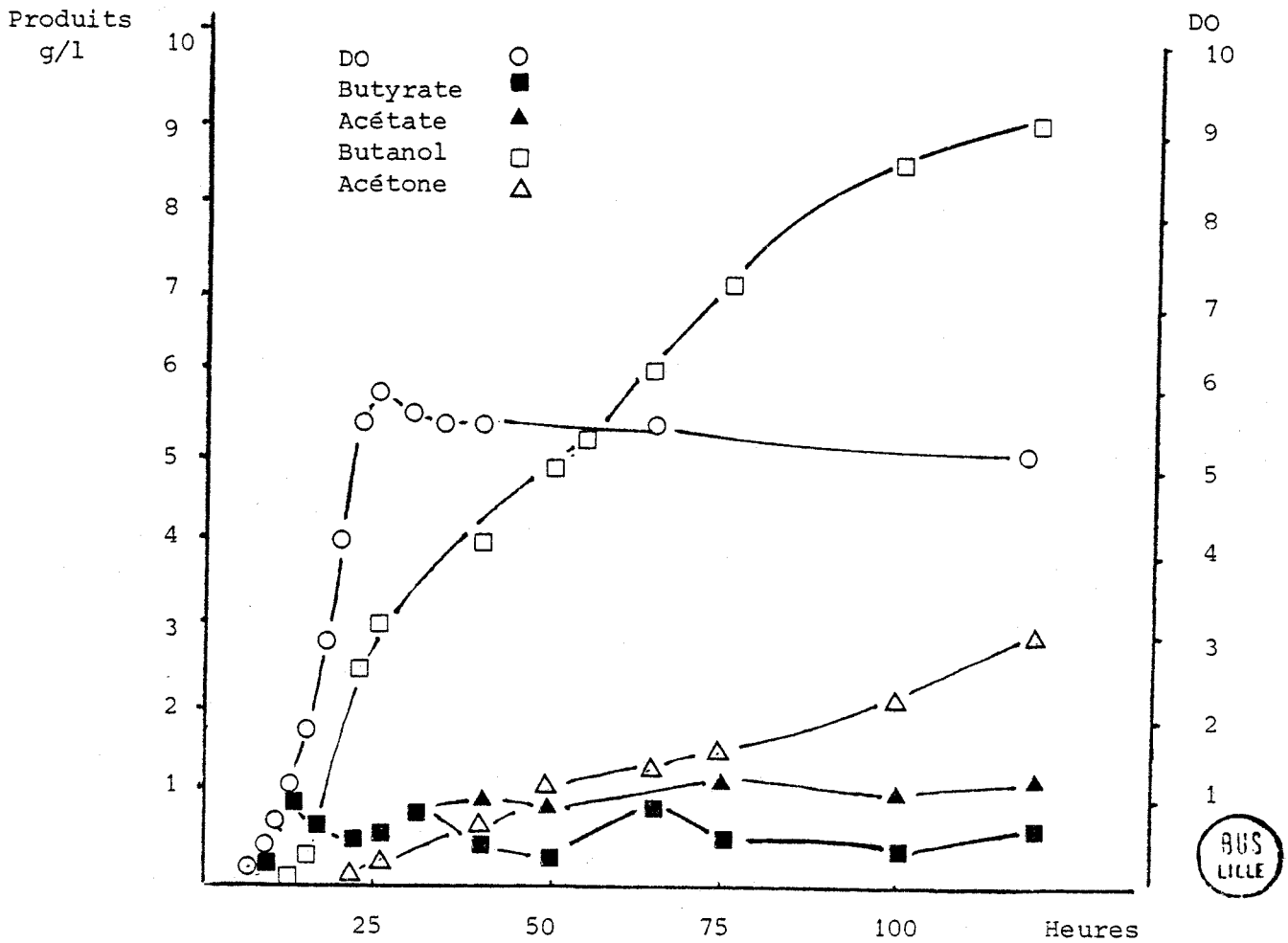


Figure 24 : Cinétique de production d'acides et de solvants de la souche 6XBD (glucose 60 g/l)



du butanol. L'effet est moins marqué avec l'acétate et l'acétone. La production de solvants n'a lieu que lorsque le pH a baissé jusqu'à 5,1. Cette valeur est en accord avec celle donnée dans la littérature (BEESCH, 1952). Comme on pouvait s'y attendre lors des essais sur l'influence du pH sur le taux de croissance, pendant 25 heures de culture, 6XBD donne plus de biomasse que de NCIB 8052 et cela se traduit par une meilleure production de solvants et une meilleure utilisation des sucres.

Les bilans de ces fermentations sont présentés dans le tableau X. Le rendement en solvants de 6XBD est de 30% supérieur à NCIB 8052. La production de solvants obtenue avec la souche 6XBD (12 g/l) est de plus de 50% supérieure à celle observée lors de l'essai en flacons (8 g/l). Le même phénomène est remarqué avec la souche de collection qui double sa production de solvants en fermenteurs. Cette différence peut s'expliquer par une meilleure utilisation des sucres (2 fois supérieure à celle en flacons) à pH régulé à 5,1. Il est également possible qu'il y ait un effet inhibiteur dû à de trop fortes pressions partielles de  $\text{CO}_2$  et d' $\text{H}_2$  dans le cas des essais en flacons.

#### I - 2.6. Conclusion

La souche de référence Clostridium acetobutylicum NCIB 8052 que nous avons utilisée nous a été fournie gracieusement par l'I.F.P. Elle est réputée donner de bonnes productions de solvants à partir d'inuline (utilisation de topinambour). Cela s'est vérifié dans nos tests en flacons pénicilline. En règle générale, cette souche se comporte bien sur les di et polyosides. Cette souche utilise le cellobiose contrairement aux données du Bergey's.

BILAN MASSE g/l	glucose consommé	Acétate	Butyrate	Acétone	Butanol	solvants totaux	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	DO max
NCIB 8052	38	0,7	0,5	2,4	5,2	7,6	14,73	0,44	4,2
6XBD	46	1,31	0,76	2,93	9	11,93	22,1	0,67	5,8

BILAN CARBONE mA	glucose consommé	Acétate	Butyrate	Acétone	Butanol	CO <sub>2</sub>
NCIB 8052	600	11	10,6	58,8	132,8	158
6XBD	600	17	13,44	60	190	196



Tableau X : Bilans de fermentation pour la souche 6XBD et NCIB 8052  
après 120 heures de culture

Les différents isolements effectués après choc thermique (80°C, 12 min.) nous ont permis de sélectionner des souches ayant des capacités d'utilisation de substrats et de production de solvants supérieure à la souche de collection choisie.

Ces résultats confirment ceux de CALAM (1980) à savoir que la recherche de nouvelles souches issues de biotopes naturels peut permettre l'obtention de souches plus performantes.

Les deux souches sélectionnées (6XBD et DLB 6 DBC) présentent une solvantogénèse intéressante sur un plus grand nombre de substrat que la souche de collection.

La production de solvants est plus importante sur les mono- et disaccharides pour la souche 6XBD.

Pour l'ensemble de ces souches, la production totale de solvants est la plus faible sur xylose. Dans ce cas, il faut remarquer que la production d'acétone est négligable, ce qui donne des rapports butanol/acétone supérieurs à 10.

Sur des pentoses (xylose, arabinose) provenant d'hydrolysats d'hémicelluloses, MES-HARTREE et al. (1982) ont aussi observé de faibles productions de solvants. Cette solvantogénèse moins intense sur pentoses semblerait provenir d'une accumulation excessive d'acides et de leur réduction plus faible en alcools correspondants. VOLESKY et al. (1983) reprennent à leur compte cette hypothèse. Mais on peut penser que les régulations des voies métaboliques de dégradation des pentoses sont différentes de celles des hexoses.

## II - ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE SOUCHE TOLERANTE AU BUTANOL

### II - 1. OBTENTION DU MUTANT B6

Par la technique classique de mutation à l'éthyl méthane sulfonate (EMS), nous n'avons pas pu obtenir de mutants modifiés dans leur résistance, c'est à dire tolérant plus de 13 g/l de butanol. Par contre, par étalement en surface sur une gélose en coin avec gradient de butanol (SZYRALSKI et al., 1952), nous avons observé sur la boîte deux zones (Figure N°25). Une zone de croissance normale et une zone où la croissance est inhibée, les colonies étant de plus en plus dispersées au fur et à mesure que l'on se rapprochait du bord où la concentration en butanol était maximale. La croissance des souches poussant dans la zone d'inhibition a été testée sur des milieux contenant des concentrations croissantes en butanol. La souche sélectionnée, dénommée B6, poussait à des concentrations en butanol supérieures à la concentration inhibitrice pour la souche sauvage 6XBD et aux autres souches testées. La souche B6, lors de la fermentation du glucose, présente la même évolution morphologique que la souche sauvage 6XBD (microscopie optique) dont elle est issue. En flacon pénicilline, elle conserve sa capacité de fermenter les mêmes sucres que la souche sauvage d'origine. Les productions de butanol sont sensiblement supérieures à celles de la souche sauvage ; seule l'inuline est fermentée un peu plus lentement.

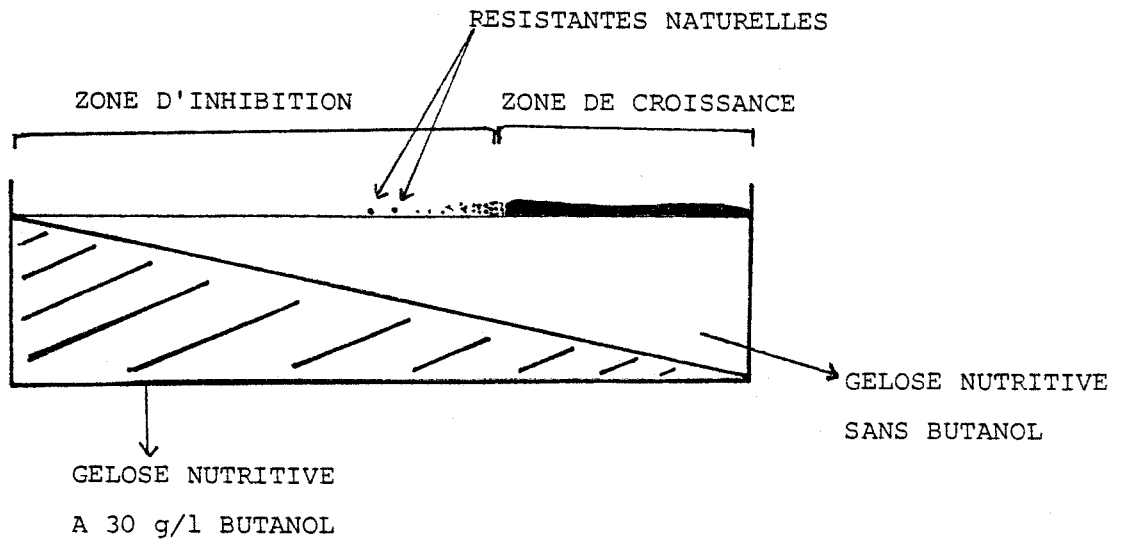


Figure 25 : Schéma du gradient de butanol

## II - 2. INFLUENCE DU BUTANOL SUR LA CROISSANCE

La résistance au butanol de la souche sauvage 6XBD, du mutant B6 et de la souche de collection NCIB 8052 a été déterminée sur les cellules végétatives (Figure N° 26). Quelque soit la concentration en butanol, le mutant B6 présente une meilleure tolérance au butanol que les deux autres souches. Si 10 g/l de butanol inhibe de 50% la croissance ( $\mu_{max}/2$ ) de NCIB 8052 et 6XBD, 11 g/l sont nécessaires pour inhiber de 50% celle du mutant B6. A 13 g/l, la croissance de B6 est encore acceptable alors que celle des autres souches est totalement inhibée (Tableau XI).

## II - 3. CARACTERISATION CINETIQUE DE LA SOUCHE B6

Les fermentations du glucose (60 g/l) par la souche sauvage 6XBD et par le mutant B6 ont été comparées en fermenteurs de 2 litres à pH régulé à 5 (Figures N°27 a & b). La souche B6 présente une meilleure croissance ( $0,9 \text{ h}^{-1}$  contre  $0,63 \text{ h}^{-1}$  pour 6XBD) parallèlement à une utilisation des sucres plus rapide et une concentration finale en cellules plus importante. Toutefois, le pourcentage d'utilisation des sucres est pratiquement identique. La souche B6 a produit 14 g/l de butanol (soit 92% de la production finale) en 30 heures de fermentation. Dans le même temps, la souche sauvage n'a produit que 5 g/l. La concentration finale en butanol est de 15,4 g/l soit 54% de plus que la quantité produite par la souche sauvage (10 g/l). Lors de ces deux fermentations, la production d'acides a été faible car la régulation du pH à 5 favorise, comme nous l'avons déjà montré, la



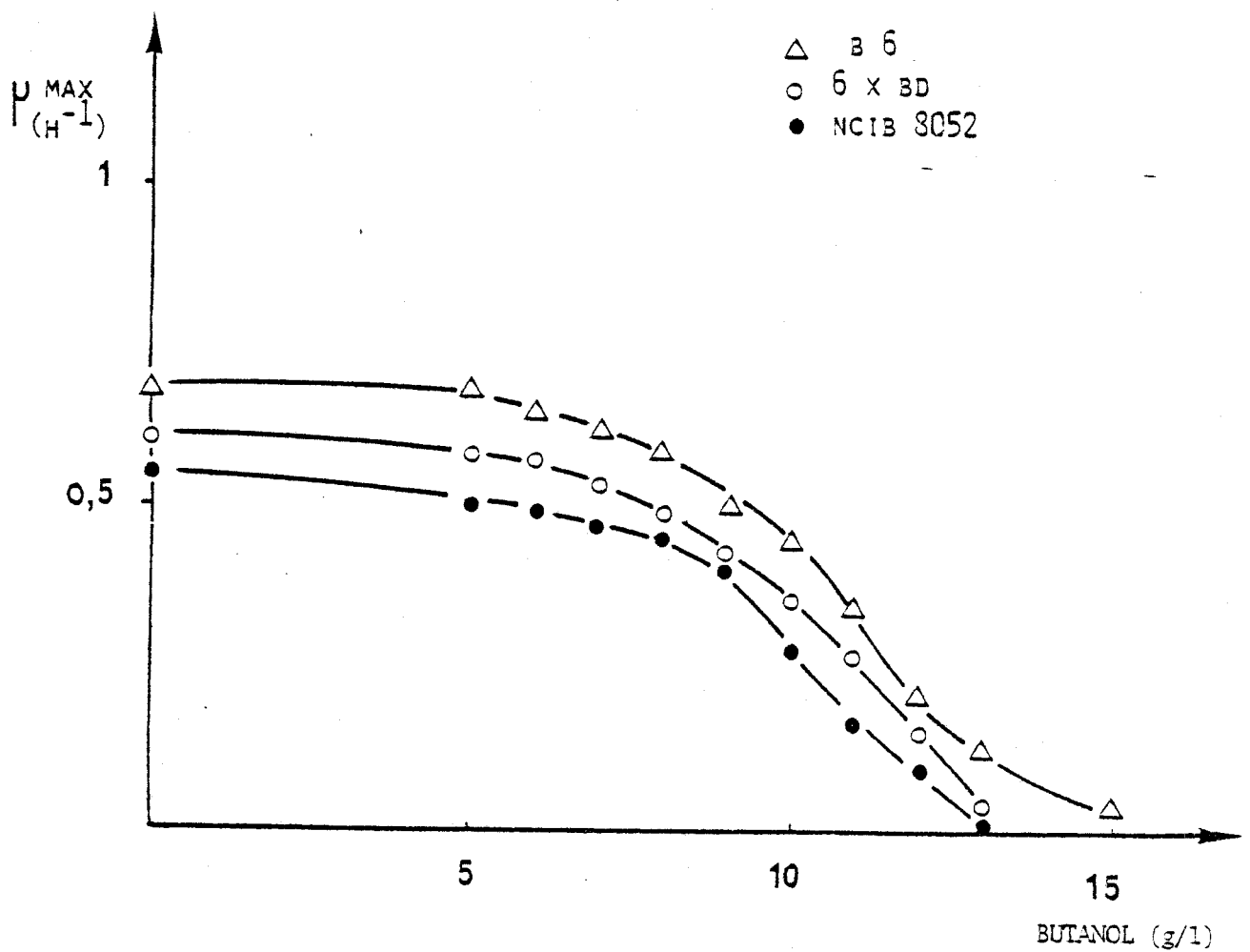


Figure 26: Influence du butanol sur le taux de croissance

Souche	μ11	μ12	μ13	μ15	Butanol produit
8052	0,17	0,10	0,008	0	9,7
6 X 3D	0,27	0,15	0,08	0	10,2
B 6	0,34	0,20	0,135	0,007	12,7

Tableau XI: Tolérance au butanol - Butanol produit sur 60 g/l de glucose



BILAN MASSE g/l	Glucose consommé	Acétate	Butyrate	Acétone	Butanol	Solvants totaux	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>
6XBD	46	1,31	0,76	2,93	9	11,93	22,1	0,44
B6	44	1,1	1,4	3,25	15,35	18,58	20,74	0,63

BILAN CARBONE mA	Glucose consommé	Acétate	Butyrate	Acétone	Butanol	CO <sub>2</sub>
6XBD	600	11	10,6	58,8	132,8	158
B6	600	15	26	69	340	193



Tableau XII : Bilans de fermentation pour la souche 6XBD et B6

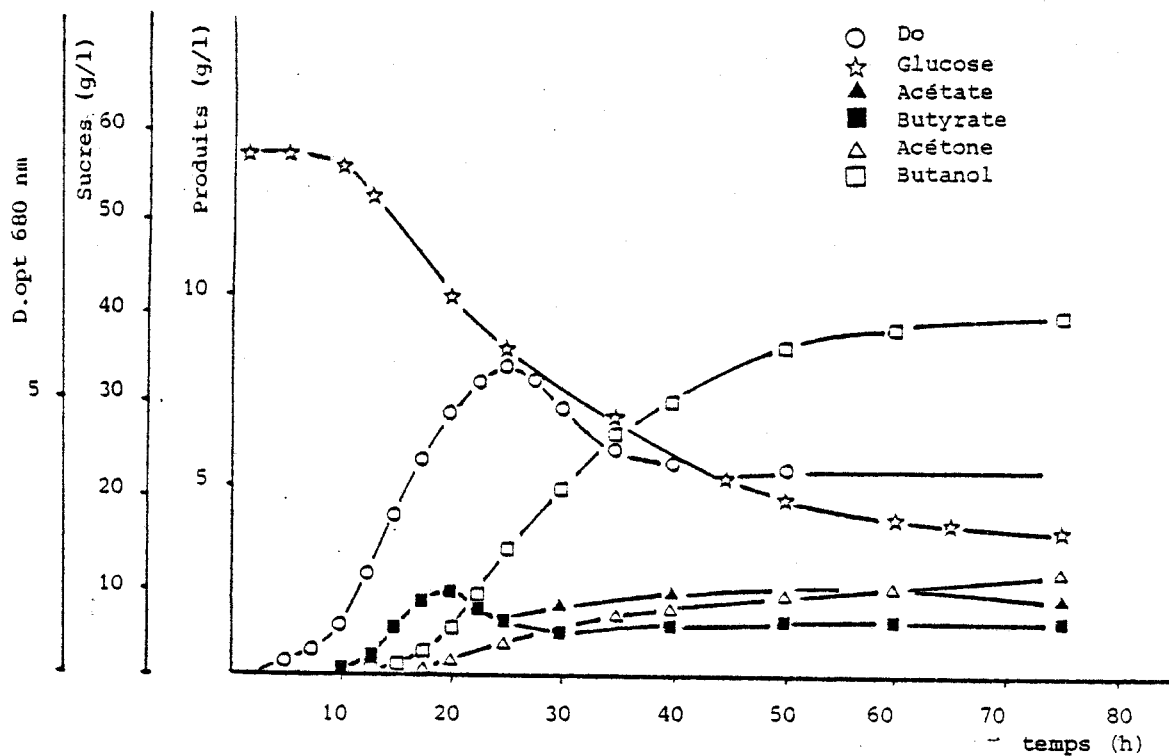


Figure 27a : Variations des concentrations observées en substrats et produits par la souche 6XBD

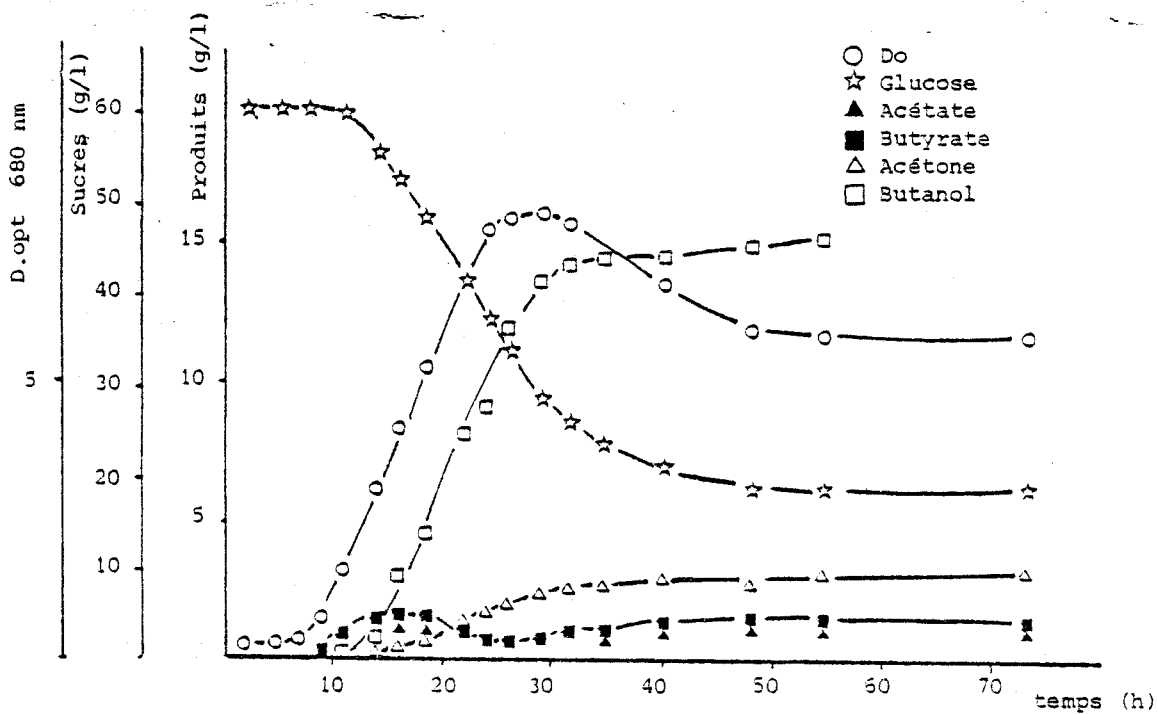


Figure 27b : Variations des concentrations observées en substrat et produits par la souche B6



production de solvants. Dans ces conditions, les rendements de conversion (solvants en gramme par gramme de sucre utilisé) sont nettement plus élevés pour la souche mutante B6. On remarque que pour la souche B6 le rendement est supérieur au rendement théorique (0,42 g solvants/g glucose pour 0,39 g solvants/ g glucose théoriquement). Cette différence doit être due à la quantité assez importante d'extrait de levure présent dans le milieu de culture (5 g/l). (Tableau XII).

#### II - 4. CONCLUSION

Le développement de la fermentation acétonobutylique est limité par la faible concentration en produits notamment le butanol qui ne dépasse généralement pas 13 g/l.

Dans le but d'améliorer les performances de cette fermentation, nous avons sélectionné un mutant B6, en utilisant une technique relativement simple. Ce mutant, bien que présentant une tolérance au butanol à peine plus élevée que celle de la souche sauvage (amélioration de 1 g/l) présente des taux de croissance et des productions de solvants en fermenteur nettement supérieurs, sans modification de l'éventail des sucres fermentés. YU-LONG LIN et al. (1983) ont isolé un mutant de Clostridium acetobutylicum ATCC 824 plus résistant puisque son taux de croissance maximal est diminué de moitié pour une concentration en butanol initial de 15 g/l tandis que la souche mère ne pousse plus à cette concentration. Cependant la production de butanol n'est guère améliorée (+ 1 g/l).

D'une façon générale, tous les travaux portant sur la résistance aux solvants concernent des bactéries en croissance donc sous leur forme végétative. On peut alors douter de l'extrapolation de ces résultats puisqu'il semblerait que ce soient les formes clostridiales qui sont responsables de la production de solvants (JONES et al., 1982).

Sur une souche de Clostridium acetobutylicum P262, les formes clostridiales résistent environ 8 heures à 17 g/l de butanol. Mais au bout de 18 heures, elles sont complètement lysées. Par contre, un mutant de membrane de P262, *lyt-1*, présente une croissance des formes végétatives améliorée (contrairement à la souche mère, le mutant présente une croissance dans un milieu contenant 12 g/l de butanol). Ces formes clostridiales sont extrêmement stables et résistent à 27 g/l de butanol pendant plus de 24 heures. Ces observations laissent entrevoir une relation étroite entre la résistance aux solvants et les propriétés de la membrane. Cette hypothèse est appuyée par MOREIRA et al. (1981) qui observaient une modification des activités de certains enzymes membranaires en présence de butanol.

Le butanol par son caractère hydrophobe, perturberait la mise en place des phospholipides entrant dans la composition de la membrane.

Il semble donc qu'il faille s'orienter, comme cela a été suggéré par M. SEBALD (1982), vers la sélection de souches résistantes à l'action d'agents ayant pour site la membrane, pour obtenir des mutants plus résistants au butanol.

III - INFLUENCE DES CONDITIONS INITIALES DE CULTURE SUR LES PRODUCTIONS  
DE SOLVANTS

La fermentation acétonobutylique est une fermentation complexe où de nombreux facteurs peuvent intervenir. Dans un premier essai, nous avons étudié en flacons pénicilline l'influence de 4 paramètres (inoculum, sucre, acétate, butyrate) sur les bilans de fermentation de la souche sauvage 6XBD, à l'aide d'une méthode permettant de dégager grossièrement l'influence des paramètres choisis. Les résultats obtenus ont ensuite été vérifiés en fermenteur de 2 l. Puis, nous avons étudié l'influence de l'ajout d'acides sur la croissance et la production de butanol par la souche B6 au regard de l'expérience acquise sur la souche sauvage. Enfin, en vue de la fermentation d'hydrolysats de polymères naturels, il nous a paru important d'examiner les bilans de fermentation de mélange des principaux sucres constitutants, c'est à dire glucose, xylose, fructose. Le saccharose a été également inclus dans cette étude car il nécessite l'intervention d'une invertase.

III - 1. INFLUENCE DES ACIDES SUR LA PRODUCTION DE SOLVANTS PAR  
6XBD

III - 1.1. Etude en tubes

Une méthode statistique basée sur la technique du carré gréco-latin a été utilisée (AUDEN et al., 1967). Elle permet de déterminer l'influence de 4 variables sur la production de solvants. Dans notre

cas, nous avons étudié l'influence de l'acétate, du butyrate, du glucose et du volume d'inoculum. Les essais sont réalisés en tubes de 16 mm non étanches sur milieu C.A.M.C. glucose. Les tubes sont incubés à 35°C en hotte anaérobie (atmosphère N<sub>2</sub> (75%)/CO<sub>2</sub> (15%)/H<sub>2</sub> (10%). Les différentes concentrations utilisées sont :

- acétate (g/l)            0 - 0,6 - 1,5 - 3 - 6
- butyrate (g/l)        0 - 1,32 - 2,64 - 4,4 - 8,8
- sucre (g/l)            36 - 54 - 72
- inoculum (% v/v)    5 - 10 - 20

L'ensemble des milieux de culture réalisés et des bilans de fermentation est donné dans le tableau ci-dessous :

Con- centration	Tubes																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
<u>Acétate</u>	i	0	0	0	0,6	0,6	0,6	1,5	1,5	1,5	0	0	3	3	3	6	6	6
	f	0,46	0,79	0,67	0,41	0,16	0,68	0,74	0,94	0,8	1,04	2,8	1,07	1,9	3,7	2,13	3,82	6,54
<u>Butyrate</u>	i	0	1,32	2,64	0	1,32	2,64	0	1,32	2,64	4,4	8,8	0	4,4	8,8	0	4,4	8,8
	f	0,085	0,078	0,082	0,085	0,85	0,02	0,66	0,17	0,33	0,93	1,6	0,83	0,88	2,8	1,23	2,5	3,9
<u>Sucres</u>	i	36	54	72	54	72	36	72	36	54	54	72	54	72	36	72	26	54
	f	0	18	45	18	48	12	48	20	20	28	58	42	41	12	52	20	35
<u>Inoculum</u>		5	10	20	20	5	10	10	20	5	10	20	20	5	10	10	20	5
<u>Butanol produit</u>		7,7	8,1	8,1	8,02	8,42	8	4,81	7,9	7,72	8,5	7,8	4,36	8,27	9,1	3,17	7,1	9,3
<u>Acétone produit</u>		2,03	2	3,15	3,11	2,5	3,8	3,8	3,1	5,3	2,8	1,38	1,97	3	2,48	2,16	2,56	2,36
<u>Solvants totaux</u>		9,73	10,1	11,25	11,13	10,92	11,8	8,61	11,0	13,02	11,3	9,18	6,33	11,27	11,58	5,33	9,66	11,66

Pour étudier l'influence d'un paramètre sur la production de solvants, on fait la moyenne des différents résultats obtenus pour une valeur déterminée de ce paramètre.

Exemple : Pour étudier l'influence du volume d'inoculum, on fait successivement les moyennes des tubes 1, 5, 9, 13 et 17 (5% d'inoculum), des tubes 2, 6, 7, 10, 14 et 15 (10% d'inoculum), des tubes 3, 4, 8, 11, 12 et 16 (20% d'inoculum).

- influence du volume d'inoculum

<u>Inoculum</u>	<u>Butanol</u> g/l	<u>Acétone</u> g/l	<u>Solvants totaux</u> g/l	<u>Sucres consommés</u>
5%	8,26	3,03	11,36	28,8
10%	6,94	2,86	9,8	28,6
20%	6,98	2,52	9,5	24,2

Un inoculum correspondant à 5% du volume à ensemerer est optimal pour la production de butanol, d'acétone et de solvants. La concentration en butanol est accrue de 15% par rapport aux essais avec 10 et 20% d'inoculum.

- Influence de la concentration en sucres

<u>Sucres</u> (g/l)	<u>Butanol</u> g/l	<u>Acétone</u> g/l	<u>Solvants totaux</u> g/l	<u>Sucres consommés</u>
36	7,7	2,8	10,43	21,2
54	7,7	2,9	10,46	26,5
72	6,6	2,65	9,3	28,0



Avec des concentrations en sucres de 36 g/l et 54 g/l, les résultats obtenus sont très voisins. Pour les tests en tubes, une concentration initiale en sucres de 36 g/l est donc "optimale". C'est donc cette valeur qui est à retenir pour la production de solvants.

- Influence de la concentration en acétate

<u>Acétate</u>	<u>Butanol</u>	<u>Acétone</u>	<u>Solvants totaux</u>	<u>Sucres consommés</u>
g/l	g/l	g/l	g/l	
0	8,04	2,32	10,36	30,8
0,6	8,09	3,26	11,36	24,6
1,5	6,34	3,9	10,24	24,6
3	7,23	2,48	9,71	22,3
6	6,52	2,36	8,9	18,3

L'acétate a assez peu d'influence sur les quantités de produits formés. Sa concentration optimale est de 0,6 g/l puisqu'elle permet une meilleure production de butanol et de solvants et plus particulièrement d'acétone. Par contre l'utilisation des sucres est meilleure lorsqu'il n'y a pas d'acétate dans le milieu.

- Influence de la concentration en butyrate

<u>Butyrate</u>	<u>Butanol</u>	<u>Acétone</u>	<u>Solvants totaux</u>	<u>Sucres consommés</u>
g/l	g/l	g/l	g/l	
0	5,61	2,6	8,23	25,6
1,32	7,52	2,44	10,08	25,3
2,64	7,94	4,02	12	28,3
4,4	7,95	2,83	10,8	27,6
8,8	8,72	2,08	11,12	19

La concentration en butyrate joue surtout sur la production de butanol. En effet, plus on ajoute de butyrate, plus la quantité de butanol produite est importante. Par contre, la production totale de solvants et l'utilisation des sucres sont optimales pour une concentration initiale de butyrate de 2,64 g/l. De façon générale, les acides ajoutés initialement dans le milieu sont consommés pendant la fermentation. L'acétate ajouté induit une légère production de butyrate, par contre il a un effet dépressif très marqué sur la production de solvants et donc, la dégradation du glucose. Le butyrate ajouté est réduit en butanol et des concentrations inférieures à 4,4 g/l n'ont pratiquement pas d'influence sur la dégradation des sucres. En fonction des résultats précédents, il est théoriquement possible de définir des conditions optimales pour la production d'un solvant particulier. Ces conditions sont les suivantes :

- pour la production maximale de butanol :

Acétate	0 g/l
butyrate	8,8 g/l

- pour la production maximale d'acétone :

Acétate	1,5 g/l
Butyrate	2,64 g/l

- pour la production optimale de solvants sans addition importante de butyrate dans le milieu :

Acétate 0,6 g/l

Butyrate 2,64 g/l

Dans tous les cas, la concentration en sucres est de 36 g/l et le volume d'inoculum représente 5% du volume mis en fermentation.

### III - 1.2. Etude en fermenteurs

La méthode statistique employée a permis de dégager très rapidement les conditions de culture permettant de maximiser la production d'un métabolite particulier. Nous avons testé en fermenteurs de 2 litres les conditions optimales pour la production de butanol et de solvants totaux et étudié l'influence de l'addition d'acétate sur la solvantogénèse. Les résultats sont comparés à ceux de la cinétique déjà réalisée en fermenteurs avec une concentration initiale en glucose de 60 g/l (cf. paragraphe I 2-5). L'addition de quantités croissantes de butyrate s'accompagne d'une production plus importante de butanol, sans modifier sensiblement la production d'acétone, ni la concentration finale en butyrate (Tableau XIII). Par contre, l'apport de butyrate réduit fortement la dégradation du sucre et augmente l'excrétion d'acétate. En présence de 100 mM de butyrate, c'est à dire dans les conditions optimales données par la méthode statistique, la réduction de butyrate est maximale (7,3 g/l) et l'on produit une importante quantité de butanol et de solvants totaux en ne consommant que 24 g/l de sucres. Etant donné le rendement de production de butanol à partir du glucose (environ 20%) il est évident que dans cet essai, près de 2/3 de cet alcool proviennent de la réduction du butyrate ajouté dans le

	N° fermenteur			
SUCRES TOTAUX	60	36	36	36
BUTYRATE INITIAL	0	2,64	8,8	8,8
ACETATE INITIAL	0	0	0	6
*SUCRES CONSOMMES	46	23	24	20
BUTANOL	9	9,4	11,2	10
SOLVANTS TOTAUX	11,9	12,5	14,7	14,3
△ ACETATE	+1,3	+3,2	+3,3	+0,9
△ BUTYRATE	+0,8	-1,64	-7,3	-6,7

\* Unité : g/l

Tableau XIII: Influence de l'addition d'acides sur la conversion des sucres en butanol et solvants.



milieu (Tableau XIII). L'addition de 6 g/l d'acétate se traduit par une moins bonne dégradation des sucres (20 g/l) et une légère augmentation du butyrate résiduel. Pour l'ensemble de ces essais, la concentration finale en acétate est élevée (entre 3 et 7 g/l) cependant, la quantité d'acétate produite lors de la fermentation est faible lorsque cet acide est ajouté en forte concentration dans le milieu (0,9 g/l contre 3,3 et 4 g/l lorsque la concentration initiale en acétate est inférieure à 3 g/l).

### III - 2. INFLUENCE DES ACIDES SUR LE TAUX DE CROISSANCE DE LA

#### SOUCHE B6

Nous avons déterminé l'effet inhibiteur des acides acétique, butyrique et lactique sur la croissance de la souche B6 en tube serti contenant 2,5 g/l de glucose à pH 6,2. Ces trois acides sont des métabolites classiques des bactéries mésophiles hydrolytiques.

#### III - 2.1. Acides seuls (Figure N° 28)

Dans les conditions expérimentales utilisées (pH 6,2 - glucose à 2,5 g/l), la croissance de la souche B6 a lieu en une seule phase. Le taux de croissance maximal observé est de  $0,62 \text{ h}^{-1}$ . De l'acétate et du butyrate sont produits ainsi qu'un peu de butanol (0,3 g/l). Les résultats obtenus sont analogues à ceux observés à pH 6,25 lors des essais de pH optimum de la souche 6XBD. Quelque soit l'acide, son addition se traduit par une baisse du  $u_{\text{max}}$ . Une réduction de moitié du

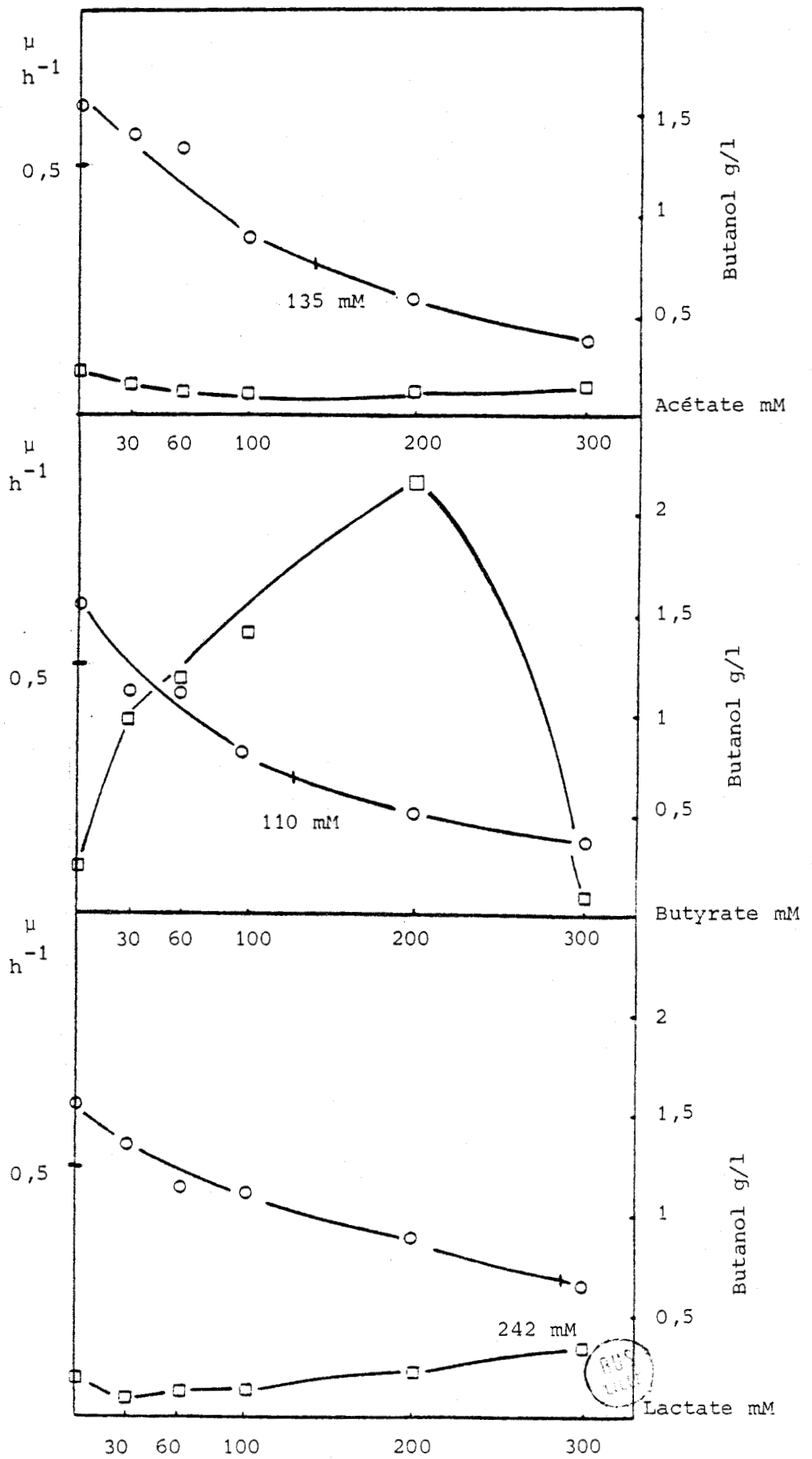


Figure 28 : Influence de la concentration en acides sur le taux de croissance et la production de butanol

taux de croissance en phase exponentielle est observée en présence de 110 mM de butyrate, 135 mM d'acétate et 242 mM de lactate (Tableau XIII).

Le lactate ne modifie guère les profils et les bilans de fermentation. L'acide acétique ne modifie ni la production de butanol, ni celle de butyrate, par contre l'acétate produit augmente notablement. A 200 mM d'ajout d'acide butyrique, la souche B6 présente toujours un taux de croissance intéressant de  $0,25 \text{ h}^{-1}$ . Comme nous l'avions déjà observé chez la souche 6XBD, des concentrations croissantes de butyrate augmentent la production de butanol.

### III - 2.2. Mélanges d'acides (Figure N° 29)

L'ajout initial simultané de deux acides, acétique et butyrique, acétique et lactique, lactique et butyrique, en proportion équimolaire, se traduit par un effet inhibiteur additif (Tableau XIV). En effet, l'acide acétique et l'acide butyrique seuls induisent une inhibition de la croissance de 50% ( $\mu_{\text{max}}/2$ ) pour une concentration initiale de 135 mM et 110 mM respectivement. La même inhibition est observée avec le mélange de 67,5 mM d'acétate et de 67,5 mM de butyrate, soit 135 mM d'acides totaux. Le même phénomène est observé chez les mélanges butyrate-lactate et acétate-lactate avec une pondération due au lactate qui est l'acide le moins inhibiteur.

Dans le cas du mélange acétate-lactate, le métabolisme est du type butyrique et le lactate est consommé totalement. Dans le cas du mélange lactate-butyrates, la production nette d'acétate est faible sans doute à

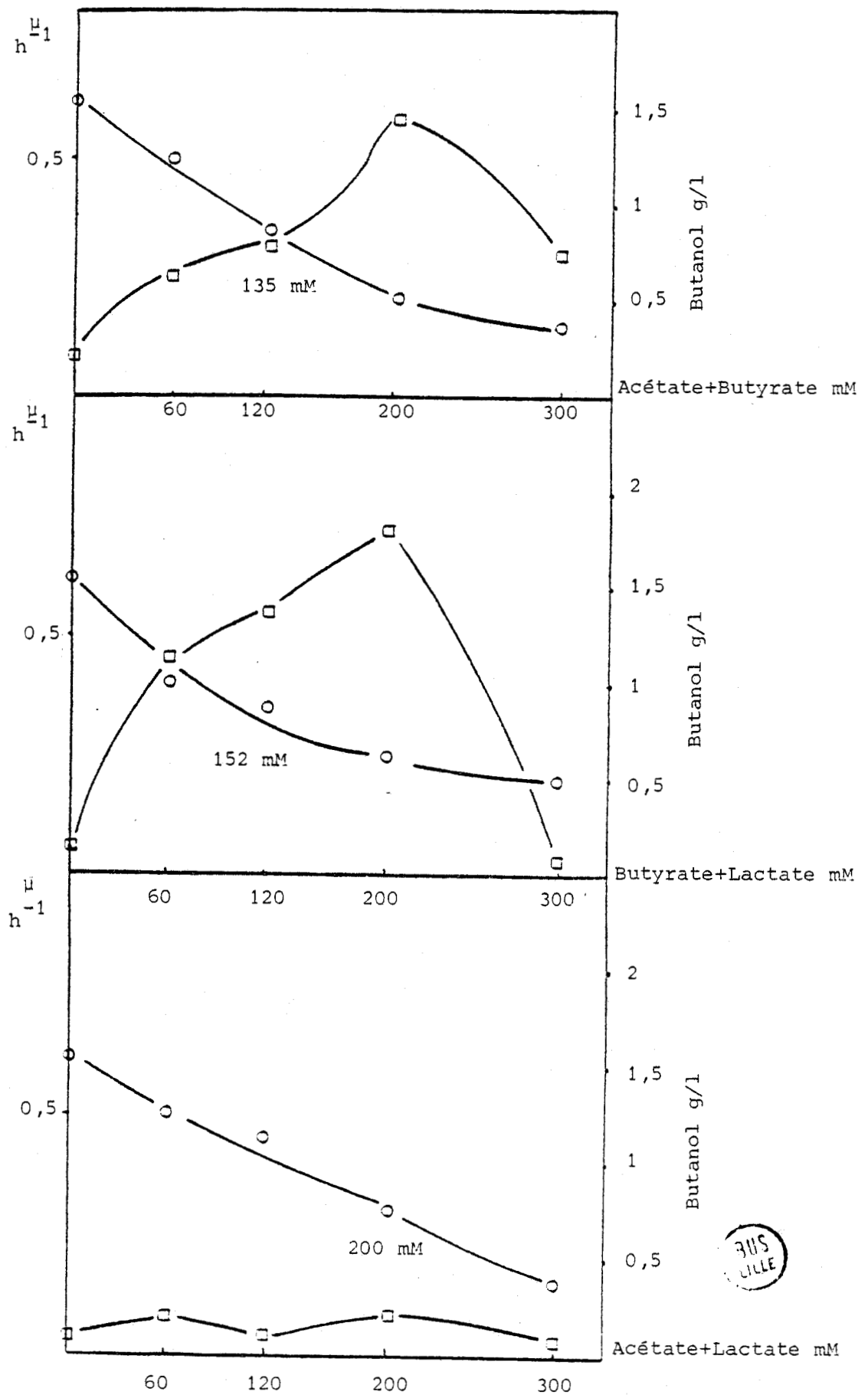


Figure 29 : Influence de la concentration en acides sur le taux de croissance et la production de butanol



Acides	Concentration
	$\mu = \mu_{max}/2$
Acétate	135 mM
Butyrate	110 mM
Lactate	242 mM
(Acétate) + (Butyrate)	135 mM (67,5+67,5)
(Acétate) + (Lactate)	200 mM
(Butyrate) + (Lactate)	152 mM

} mélange  
équimolaire

Tableau XIV : Concentrations en acides pour lesquelles le taux de croissance diminue de moitié.



cause de son utilisation en présence de lactate. Ceci est souligné par la consommation de lactate et la production de butyrate et butanol importante à 60 et 120 mM d'acides.

Il faut remarquer que dans tous les cas, le butanol n'est produit en quantité significative qu'en présence de butyrate.

Par ailleurs, un phénomène analogue à une croissance diauxique a été observé, surtout en présence de butyrate. Ne disposant pas de données cinétiques autres que la turbidimétrie, il est difficile d'émettre une hypothèse. Cependant, ce phénomène a été observé pour de bonnes productions de butanol. Il peut donc s'agir d'un changement de métabolisme de type butyrique vers le type butylique.

### III - 3. CONCLUSION (Figure N° 30)

Récemment GOTTSCHAL et MORRIS (1981) ont montré en culture discontinue, que la production de solvants par Clostridium acetobutylicum ATCC 824, pouvait être induite précocement par l'addition d'acétate et de butyrate (10 à 12 mM chacun). D'autres travaux (BAHL et al., 1982) montrent en culture continue, un changement de fermentation (acidogène vers solvantogène) quand du butyrate (60 mM) est ajouté au milieu (pH 5).

Nos propres résultats montrent que l'addition de 0,6 g/l d'acétate aurait un effet négatif sur la production de solvants tandis que l'addition de concentrations croissantes de butyrate (jusqu'à 8,8 g/l) augmente la production de butanol. Une moindre dégradation des sucres est observée dans ces cas-là, et donc une partie de ces acides est utilisée pour leur conversion en solvants. La ré-incorporation de ces

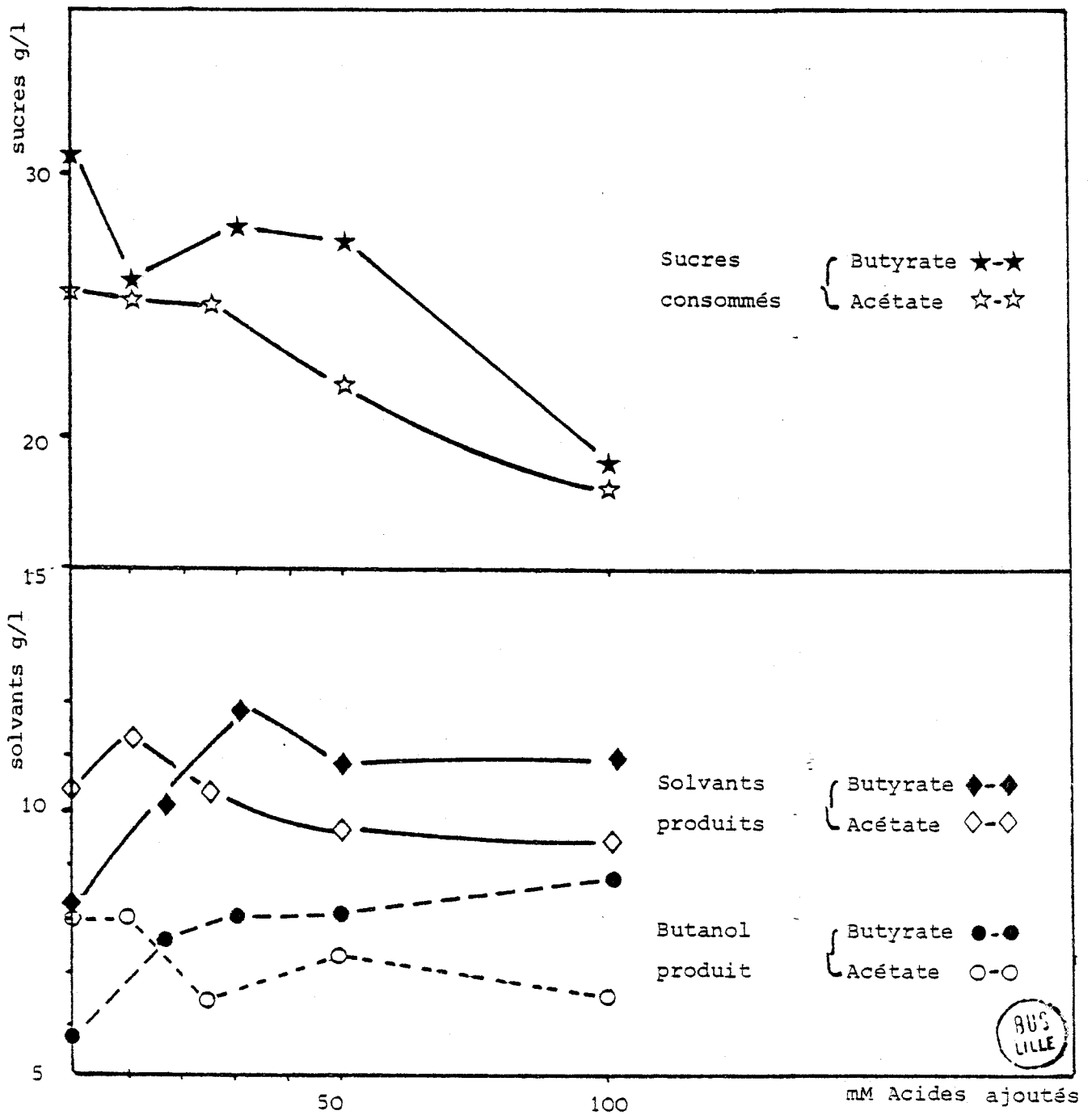


Figure 30 : Influence des concentrations en acétate et butyrate sur la production de solvants et l'utilisation des sucres.

acides en cours de fermentation a d'ailleurs été montré à l'aide d'acides marqués au  $^{14}\text{C}$  (WOOD, 1945), résultats qui ont été confirmés par la suite (HAGGSTRÖM et MOLIN, 1980). Il semble donc que le pH ne soit pas uniquement responsable de la solvantogénèse et que d'assez hautes concentrations en acides soient nécessaires. Le mécanisme de cette stimulation n'est pas connu. D'après MONOT (1983), il s'agit en fait d'une valeur seuil en acide non ionisé (comprise entre 0,6 g/l et 1,9 g/l) et donc dépendante à la fois du pH et de la concentration en acide totale.

On peut d'ailleurs suggérer que ces acides joueraient un rôle d'induction au niveau de certains enzymes tels que les alcools déshydrogénases.

Mais les expériences complémentaires que nous avons effectué prouvent qu'un effet inhibiteur apparait dès l'ajout d'acides. La souche B6 présente toujours un taux de croissance acceptable jusqu'à 100 mM. A 200 mM d'ajout, une légère croissance est observée ; or, cette concentration est donnée par WANG (1981) comme inhibant totalement la croissance de Clostridium acetobutylicum.

La production maximale de butanol a été observée par une addition de 200 mM d'acides soit acétique, soit butyrique ou les deux ensemble. Ces acides, directement impliqués dans les voies métaboliques, ayant atteint une certaine valeur, déclencheraient la fermentation solvantogène. On peut supposer que tel un mécanisme de rétro-inhibition, ils inhiberaient leur propre synthèse et en même temps activeraient les enzymes responsables de la production de solvants.

De nos résultats, il apparaît que les acides acétique et butyrique ont un effet inhibiteur additif. Quelque soit le mécanisme d'inhibition impliqué, les deux acides ayant des pka assez proches, il semble que ce soit plus la concentration totale en acide que la nature de l'acide qui soit responsable de l'inhibition de la croissance.

Quelque soit sa concentration en présence de lactate, l'acétate ne déclenche pas la solvantogénèse puisqu'il est utilisé pour la synthèse de butyrate comme cela se passe chez Clostridium butyricum (KUTZNER, 1963) et Clostridium tyrobutyricum (The Prokaryotes, 1982).

Ces propriétés permettent d'envisager lors du couplage hydrolyse de la cellulose-solvantogénèse, la ré-utilisation des acides produits au cours de la fermentation de la cellulose sans avoir un effet inhibiteur marqué.

IV - INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU SUBSTRAT SUR LES PRODUCTIONS DE  
SOLVANTS PAR LA SOUCHE B6

Dans le couplage hydrolyse-solvantogénèse, la composition en sucres du milieu peut varier avec la nature des polymères hydrolysés. Or, nous avons déjà vu que sur xylose, la souche 6XBD et la souche B6 produisaient peu d'acétone et que la production de solvants totaux était plus faible que sur hexose. Nous avons donc examiné le comportement de la souche B6, pré-cultivée sur glucose, en fermenteur de 2 litres sur différents sucres pouvant être utilisés comme substrats pour la production d'acétone-butanol. Ces sucres (glucose, xylose, fructose et saccharose) sont testés soit seul, soit en mélange.

IV - 1. SUCRES SEULS

Quelque que soit le sucre fourni, les cinétiques de fermentation sont classiques (Figures N° 31, 32, 33, 34). Dans tous les cas, la vitesse de dégradation maximale du substrat coïncide à pH 5 avec la vitesse de production maximale de butanol. La synthèse de solvants démarre avant que la concentration maximale en acides ne soit atteinte et cesse en même temps que la consommation des sucres.

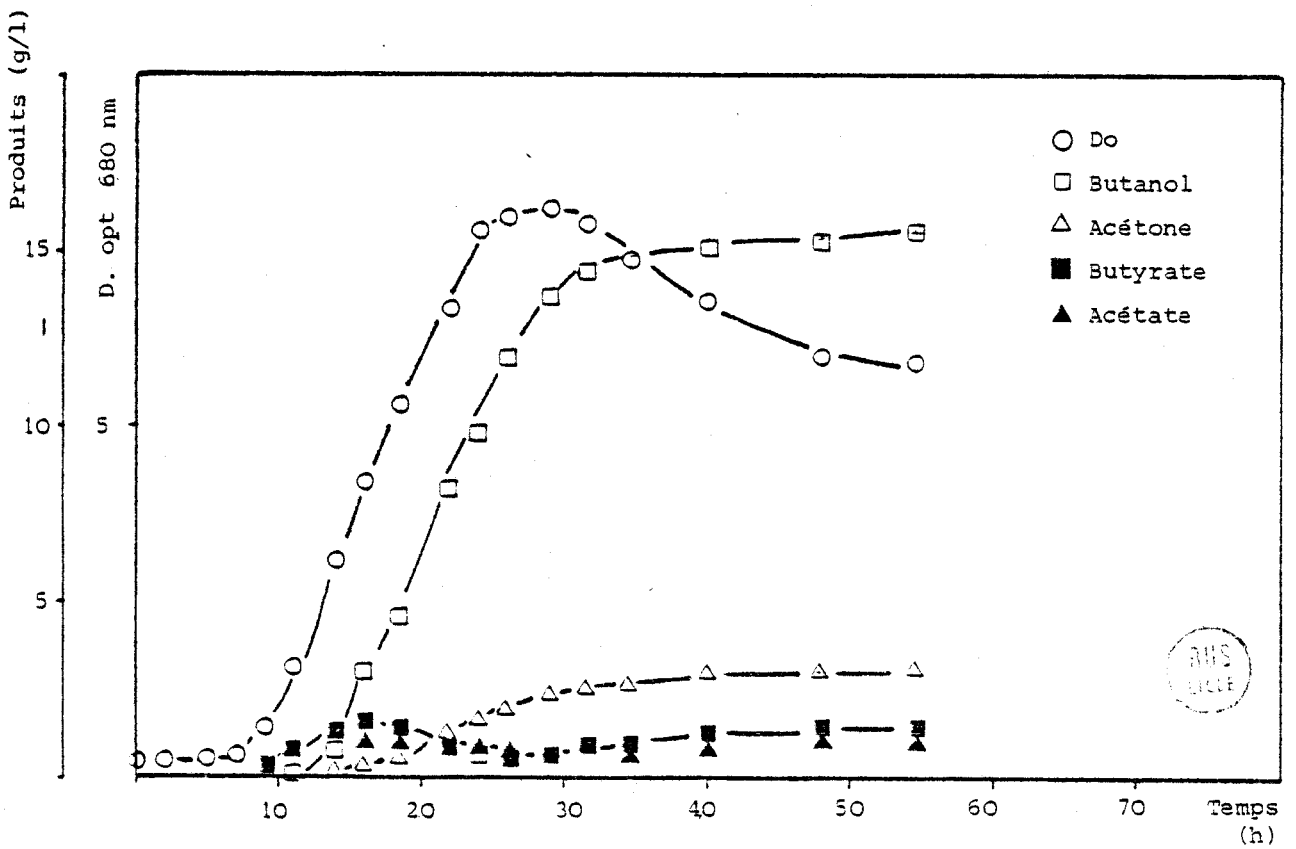
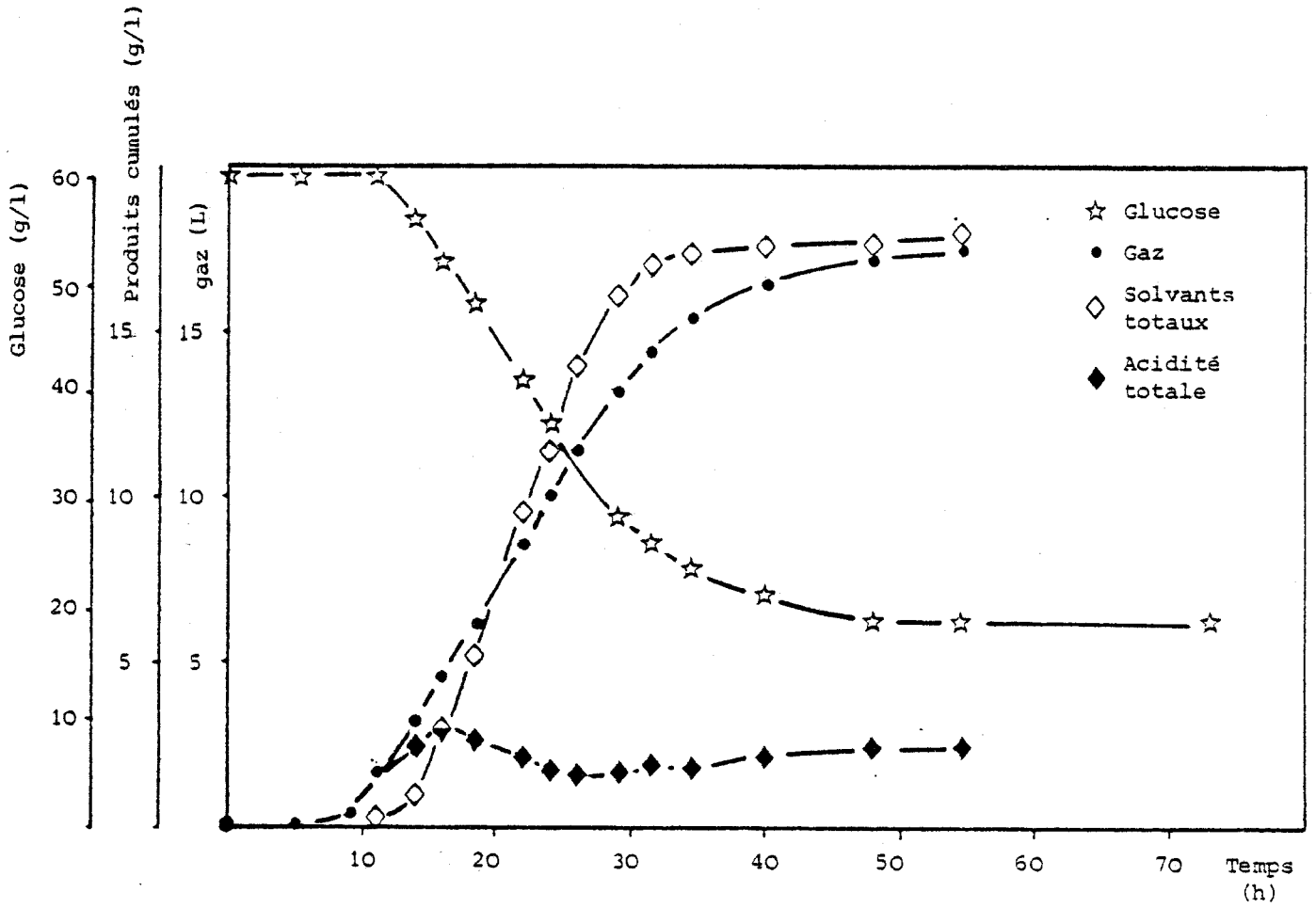


Figure 31 : Cinétique de fermentation du glucose par la souche B6

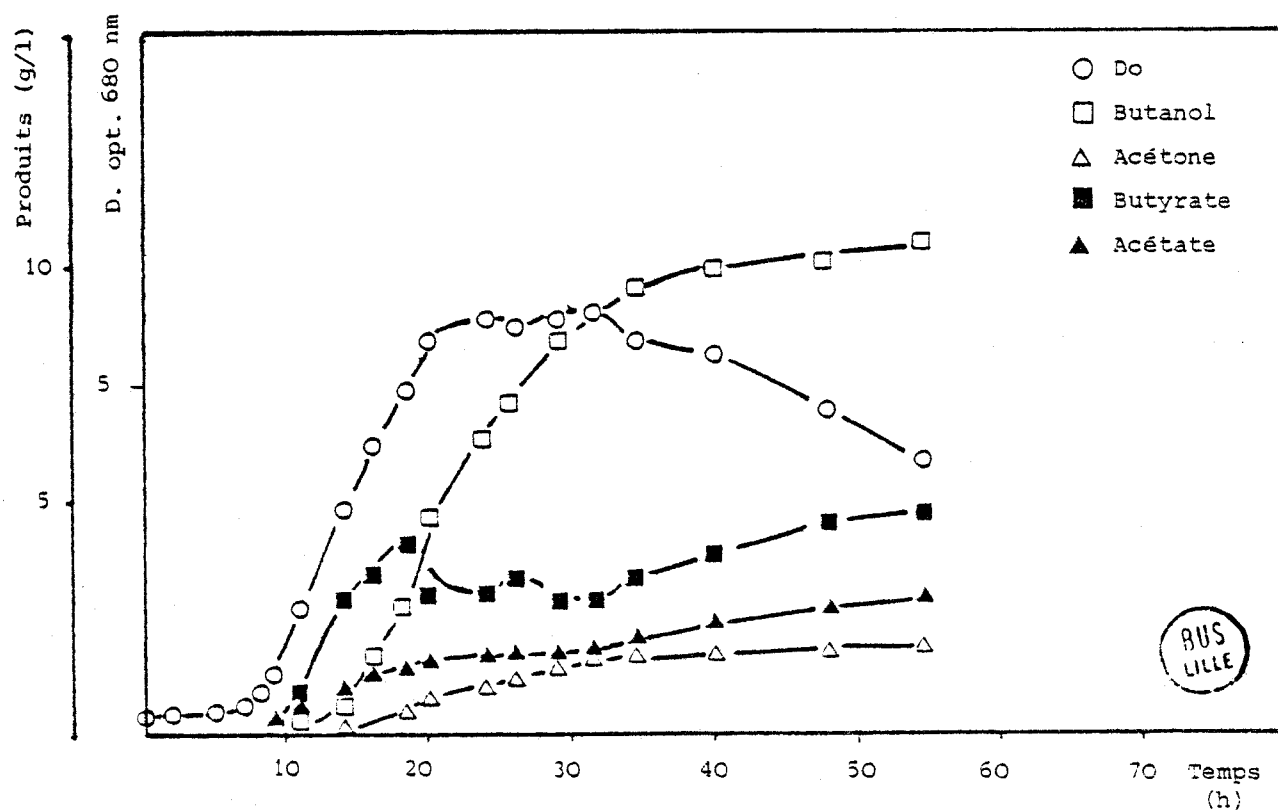
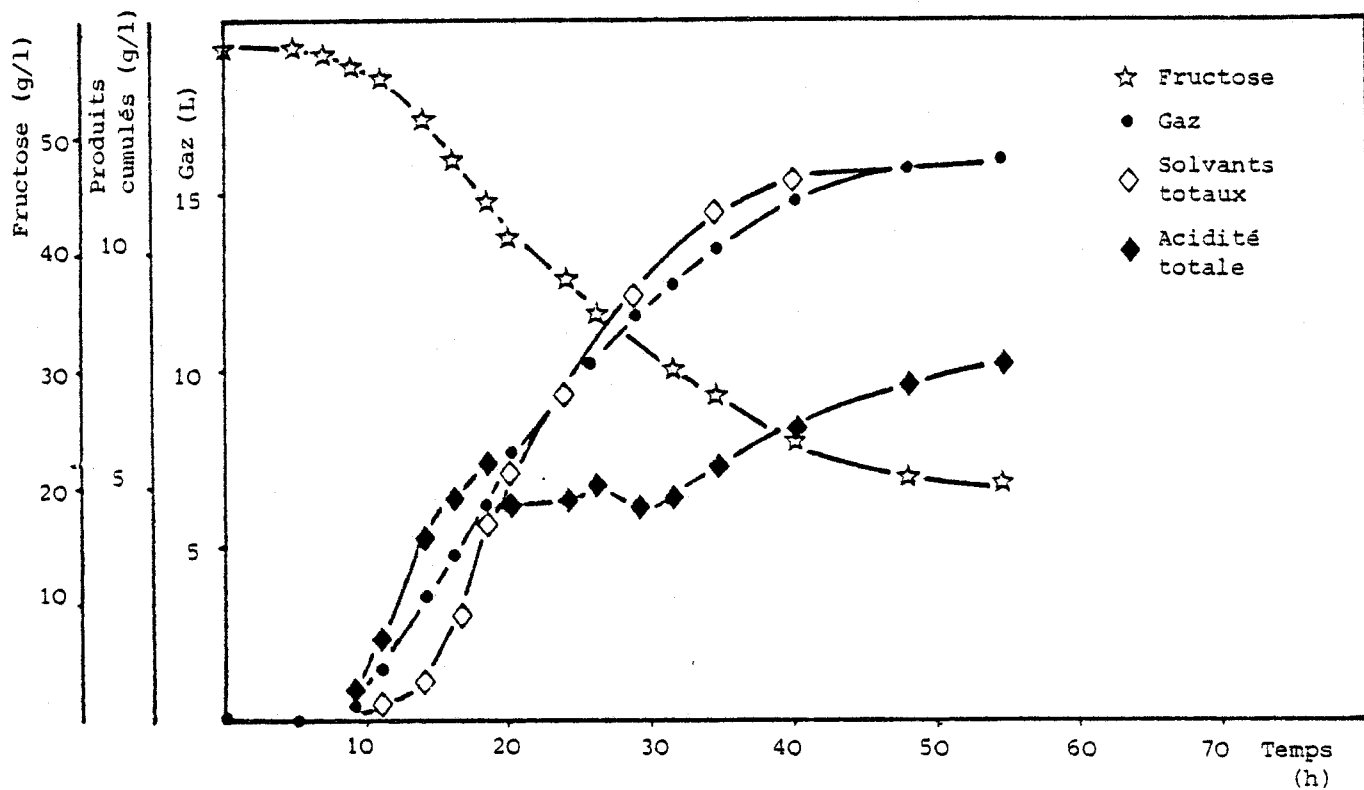


Figure 32 : Cinétique de fermentation du fructose par la souche B6



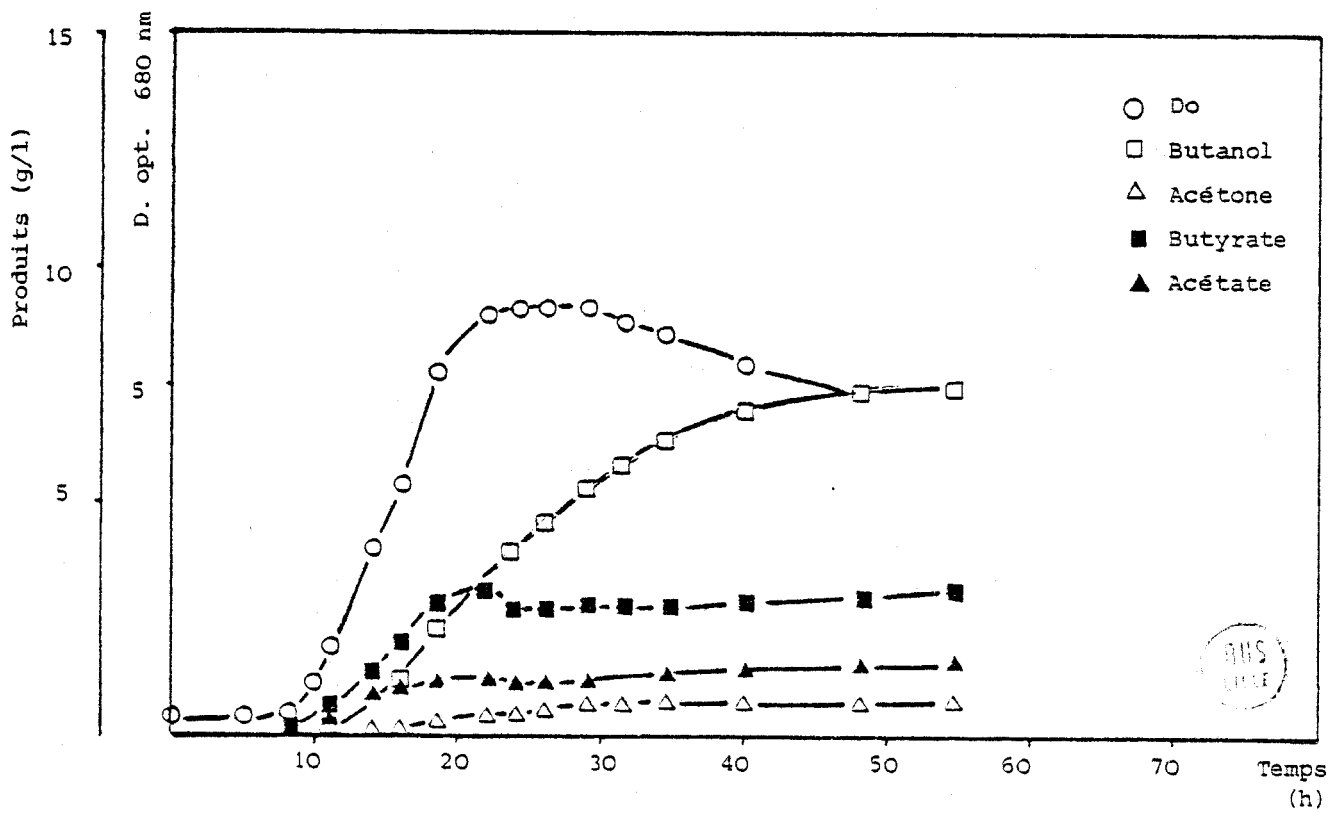
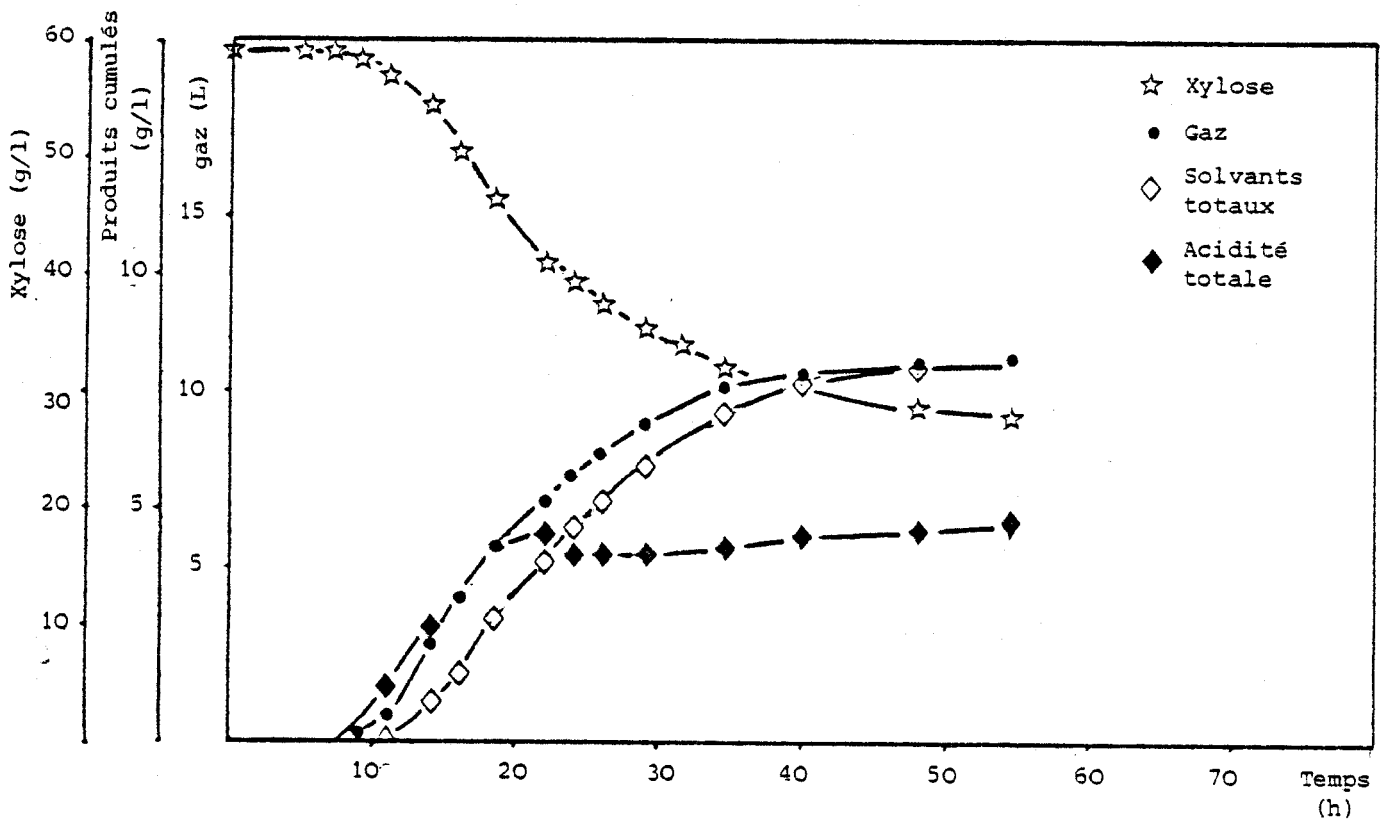


Figure 33 : Cinétique de fermentation du xylose par la souche B6

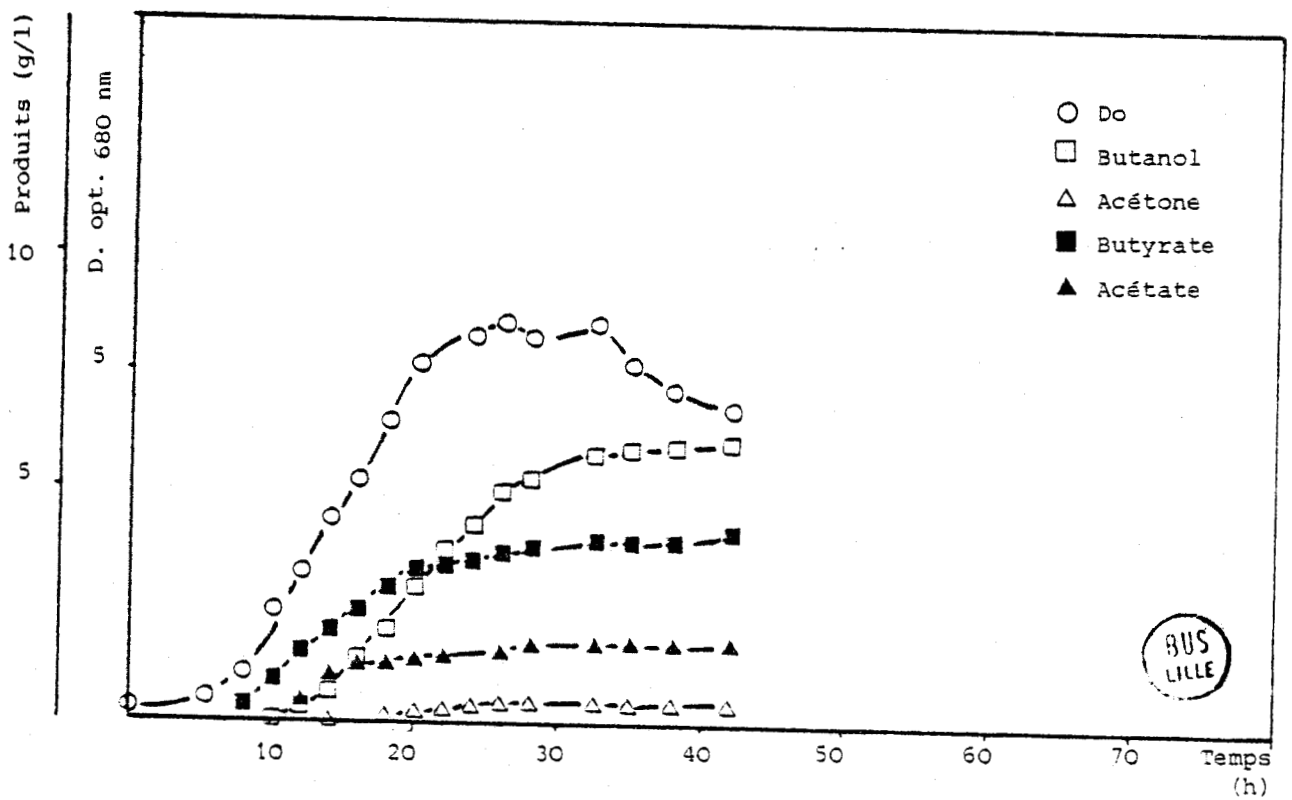
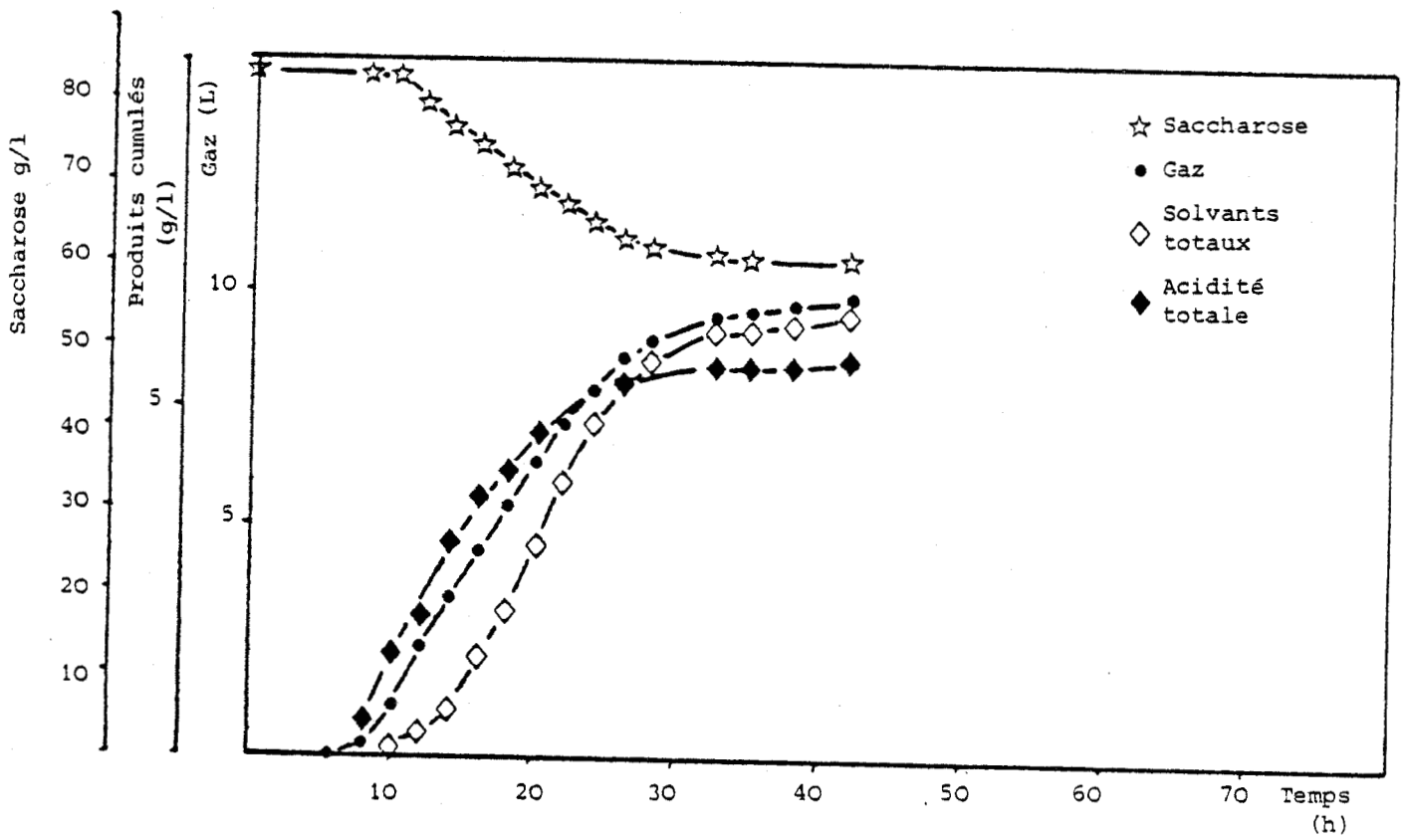


Figure 34 : Cinétique de fermentation du saccharose par la souche B6

On peut constater une hiérarchie très nette entre les différents sucres étudiés (Tableau XV) que ce soit au niveau des paramètres cinétiques (taux de croissance, vitesse de dégradation) ou au niveau des bilans (sucres consommés, métabolites produits) : glucose, fructose, xylose, saccharose.

Une seule exception est cependant à noter : le taux de croissance le plus faible est obtenu sur xylose.

#### IV - 2. MELANGE DE SUCRES

Le glucose étant le sucre le plus facilement utilisé, il est présent dans tous les mélanges. Les cinétiques ont la même allure avec les mélanges de sucres que celles décrites précédemment (Figures N° 35, 36, 37). La dégradation des deux sucres du mélange est simultanée et la vitesse maximale de consommation du glucose est inchangée par rapport à celle observée lors de la croissance sur glucose seul.

Par contre, la vitesse de consommation du sucre co-substrat est toujours inférieure à celle observée lors des essais précédents. Le meilleur taux de conversion des sucres en butanol est obtenu avec le mélange glucose + fructose bien que la consommation des sucres et la production de solvants aient été les plus faibles. L'adjonction de xylose ou de saccharose au glucose augmente les taux de conversion en acétone.

Sucres	Sucres Consommés g/l	Vitesse de dégradation du sucre $\text{g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$	Solvants g/l	
Glucose seul	44	- 2,3	18,6	
Fructose seul	39,7	- 1,75	12,3	
Xylose seul	32,5	- 1,60	8,26	
Saccharose seul	24	- 1,35	6,5	
Glucose + Fructose	25 14	39	- 2,4 - 1,1	12,5
Glucose + Xylose	36,8 20,2	57	- 2,2 - 0,9	16,2
Glucose + Saccharose	36,7 12,3	49	- 2,36 - 1,08	12,8

Tableau XV : Vitesses maximales de dégradation de substrats.  
Production maximale de solvants observée et sucres  
consommés.



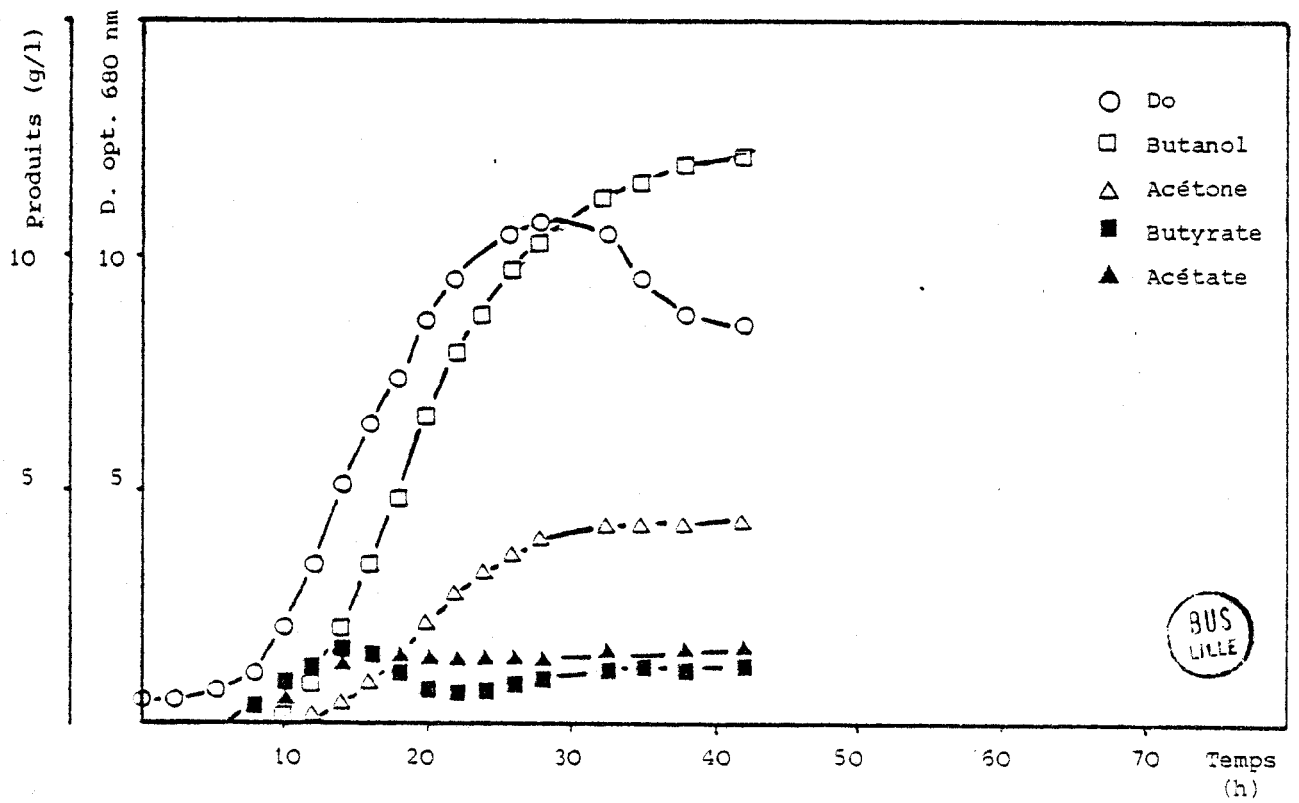
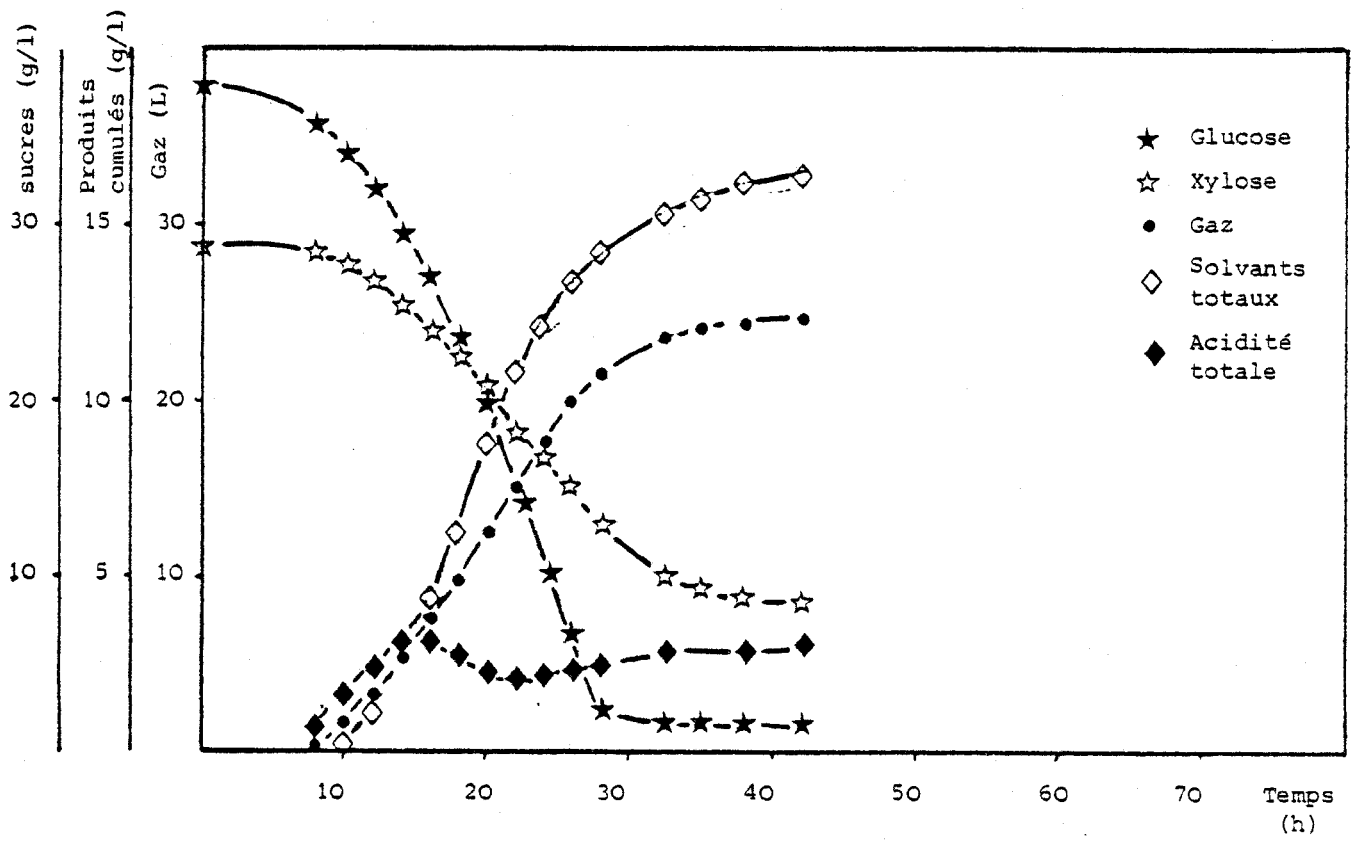


Figure 35 : Cinétique de fermentation du glucose + xylose par la souche B6

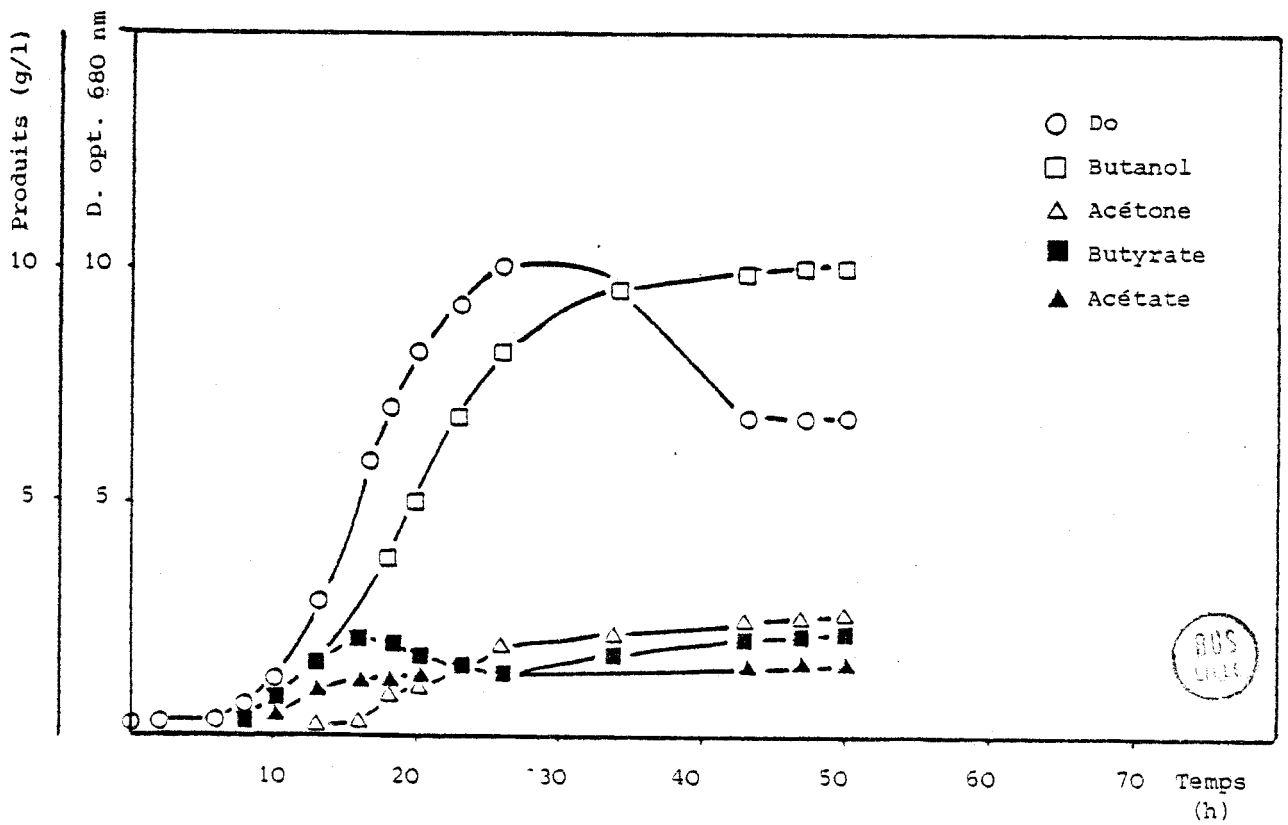
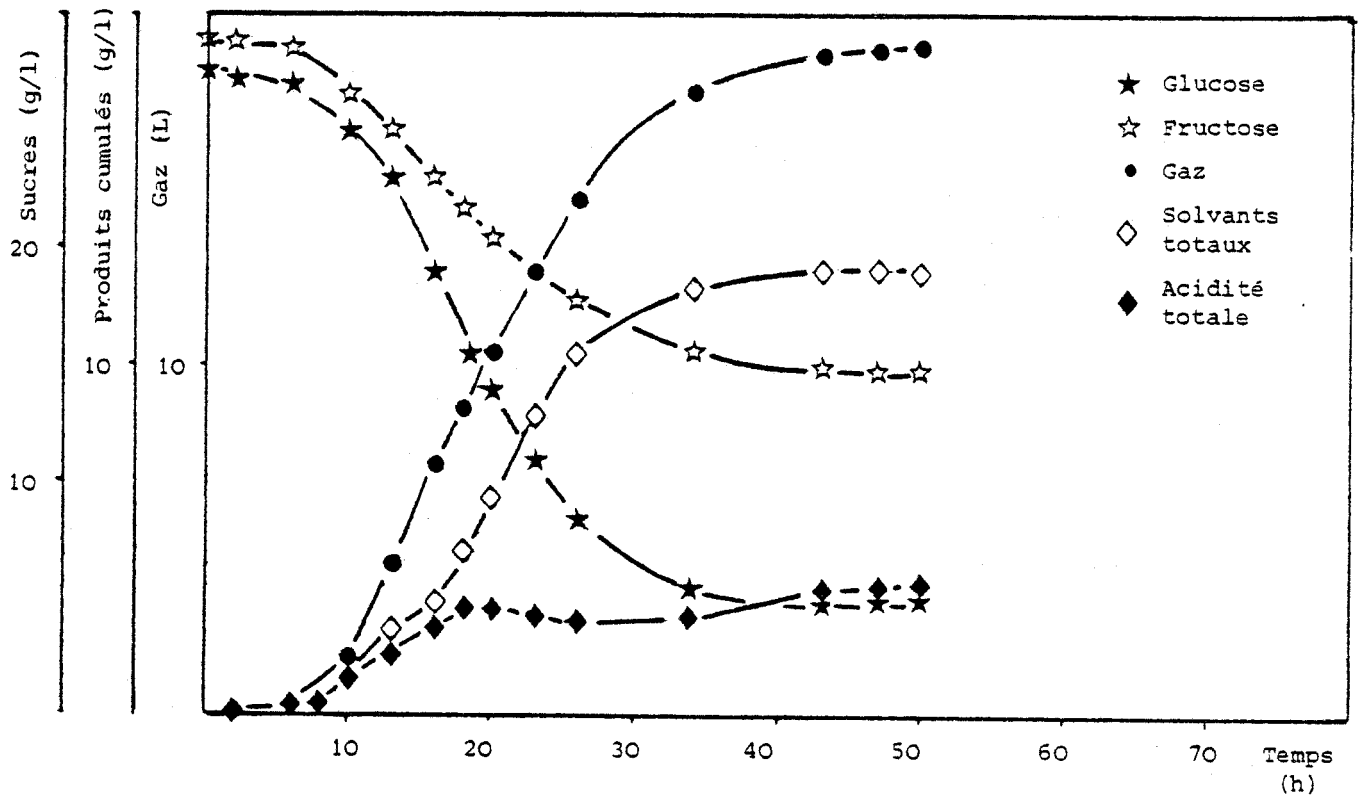


Figure 36 : Cinétique de fermentation du glucose + fructose par la souche B6

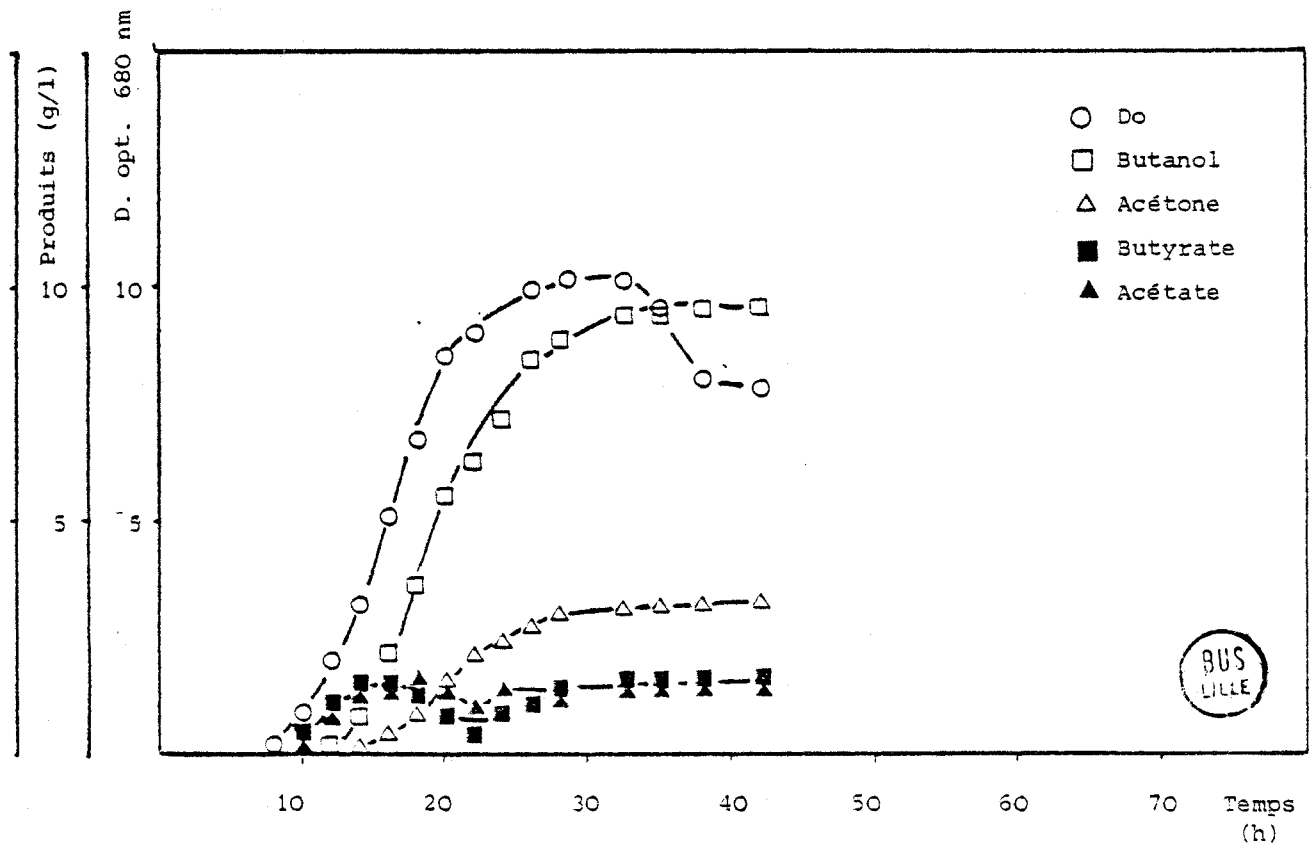
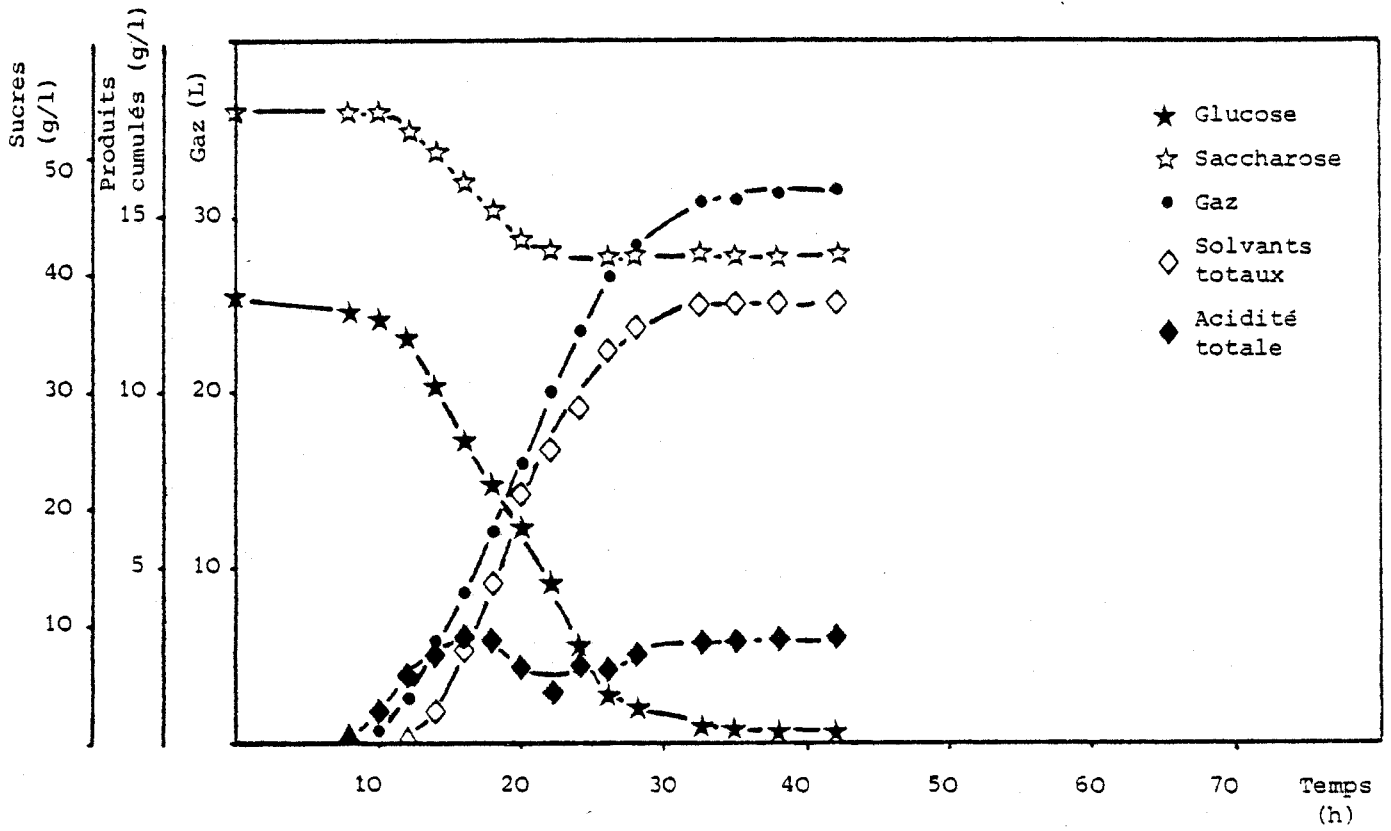


Figure 37 : Cinétique de fermentation du glucose + saccharose par la souche B6



#### IV - 3. CONCLUSION

Lorsque la souche B6, pré-cultivée sur glucose est placée sur un sucre différent, le fait qu'il n'y ait pas de temps d'adaptation permet de penser que les enzymes responsables de l'assimilation et de la dégradation du substrat sont constitutifs. De plus, aucun phénomène de diauxie tel que le décrit MONOD (1942) n'a été observé ni à fortes concentrations, ni à faibles concentrations (0,5 à 2 g/l) en substrat. Si ce phénomène avait eu lieu, le sucre le moins favorisé n'aurait pas été consommé en même temps que l'autre sucre co-substrat.

La fermentation de mélanges de sucres comprenant le glucose démontre nettement que le glucose est le substrat préférentiel de Clostridium acetobutylicum B6. Avec une culture de Clostridium acetobutylicum ATCC 4259 sur mélasses, FAN (1982) a aussi observé une utilisation simultanée du glucose et du fructose. Bien qu'il n'y ait pas de croissance diauxique, nos résultats indiquent clairement un effet inhibiteur du glucose sur la vitesse de transport ou de dégradation du sucre co-substrat.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises à l'égard de cet effet inhibiteur du glucose. On peut suggérer par exemple que quelque soit le système de transport actif utilisé par la bactérie (translocation de groupe ou gradients de protons), l'affinité du système serait plus important pour le glucose.



V - CO-CULTURES ENTRE UNE BACTERIE SOLVANTOGENE ET UNE BACTERIE  
CELLULOLYTIQUE MESOPHILE

V - 1. ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE SOUCHE MESOPHILE  
CELLULOLYTIQUE

Pour tenter le couplage hydrolyse de la cellulose-solvantogénèse par une population mixte gnotoxénique, nous devons disposer d'une souche mésophile ayant des capacités hydrolytiques élevées.

V - 1.1. Isolement

Des enrichissements mésophiles sur cellulose papier Whatman N°1 (5 g/l) ont été réalisés à partir de digesteurs anaérobies méthanisant des lentilles d'eau. Après deux transferts successifs (5%, v/v) à une semaine d'intervalle, la culture mixte enrichie dégradait totalement la cellulose en moins d'une semaine. Après dissémination et incubation pendant une semaine en chambre anaérobie sur milieu gélosé à 5 g/l de cellulose Whatman finement broyée, les colonies isolées ont été classées et sélectionnées en fonction de leurs activités hydrolytiques (suivi des cinétiques de dégradation de 5 g/l de cellulose par dosage en chromatographie en phase gazeuse des métabolites). La souche MC4 retenue donne une colonie à bord lisse, mate, de couleur crème, entourée d'un halot clair très fin.

V - 1.2. Caractéristiques morphologiques et culturales de la souche MC4

La pureté de la souche, dénommée MC4, est contrôlée avant chaque utilisation par dissémination sur milieu gélosé à 5 g/l de cellobiose. La souche MC4 est anaérobie stricte, sporulée, gram(-). Les cellules sont des bacilles légèrement incurvés, isolés ou par paire, mesurant 0,15-0,3 um x 2-5 um. Ces cellules, durant la phase exponentielle, sont très mobiles. Les spores sont ovales, terminales et très déformantes. Elles sont résitantes à un choc thermique (80°C - 30 mn). La souche MC4 fermente peu de substrats (Tableau XVIa). Hormis la cellulose, elle utilise le cellobiose et le glucose. le xylane, le xylose et l'arabinose, constituants essentiels des hémicelluloses sont utilisés. L'éthanol, le lactate, l'acétate, le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub> sont les seuls produits de fermentation quelque soit le substrat osidique. Le taux de croissance maximum sur cellobiose (Figure N° 38 a) est obtenu pour un pH de 6,2-6,4. L'optimum de température (Figure N° 38 b), tant au point de vue latence que taux de croissance maximum se situe à 34-35°C. On observe lors de la fermentation sur glucose ou cellobiose par la souche MC4, une augmentation importante mais temporaire de la viscosité du milieu de culture qui est due à un polymère comme cela a été observé chez Acetivibrio cellulolyticus (PATEL et BREUIL, 1981). Ce polymère, observable au microscope à contraste de phase, inclut les bacilles dans une "gelée".

Tableau XVI a : SUBSTATS FERMENTES PAR LA SOUCHE MC4

<u>glucides fermentés</u>		
Glucose	Arabinose	Cellulose
Cellobiose	Mannose	
Xylose	Xylane	
<u>glucides non fermentés</u>		
Mannitol	Esculine	Rhamnose
Lactose	Melezitose	Trehalose
Saccharose	Raffinose	Fructose
Maltose	Sorbitol	Melibiose
Amidon	Galactose	
<u>Autres essais donnant des résultats négatifs</u>		
Indol		
Glycerol		
Gelatine		

Tableau XVI b : BILANS DE FERMENTATION PAR LA SOUCHE MC4

Substrat	Glucose	Cellobiose	Cellulose
Substrat consommé g/l	8	7	5
Acétate g/l	4,2	3,2	2,2
Lactate g/l	0,7	1,8	0,34
Ethanol g/l	0,74	0,45	0,16
Sucres totaux solubles	-	-	0,4
Acétate (1)	1,577	1,464	1,19
Lactate (1)	0,176	0,488	0,124
Ethanol (1)	0,347	0,229	0,113
CO2 calculé (1)	1,924	1,693	1,3
Sucres totaux solubles	-	-	0,08
A T P (1)	3,68	3,65	2,62
% Carbone retrouvé	105 %	110 %	79,2%

(1) Mole/Mole équivalent anhydroglucose consommé



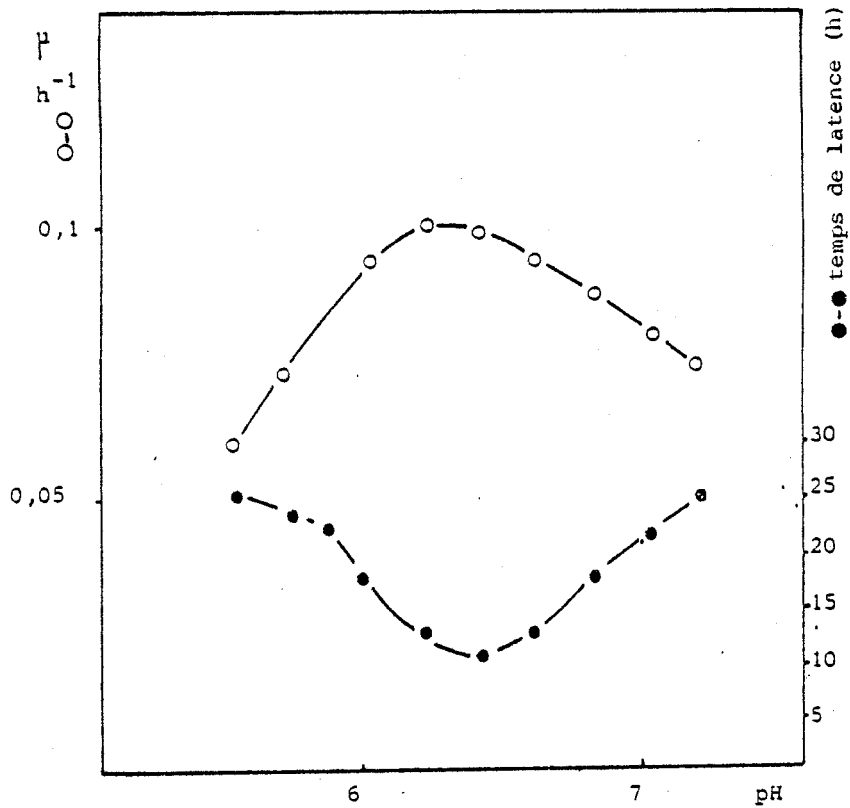


Figure 38a: Influence du pH sur le taux de croissance de la souche MC4

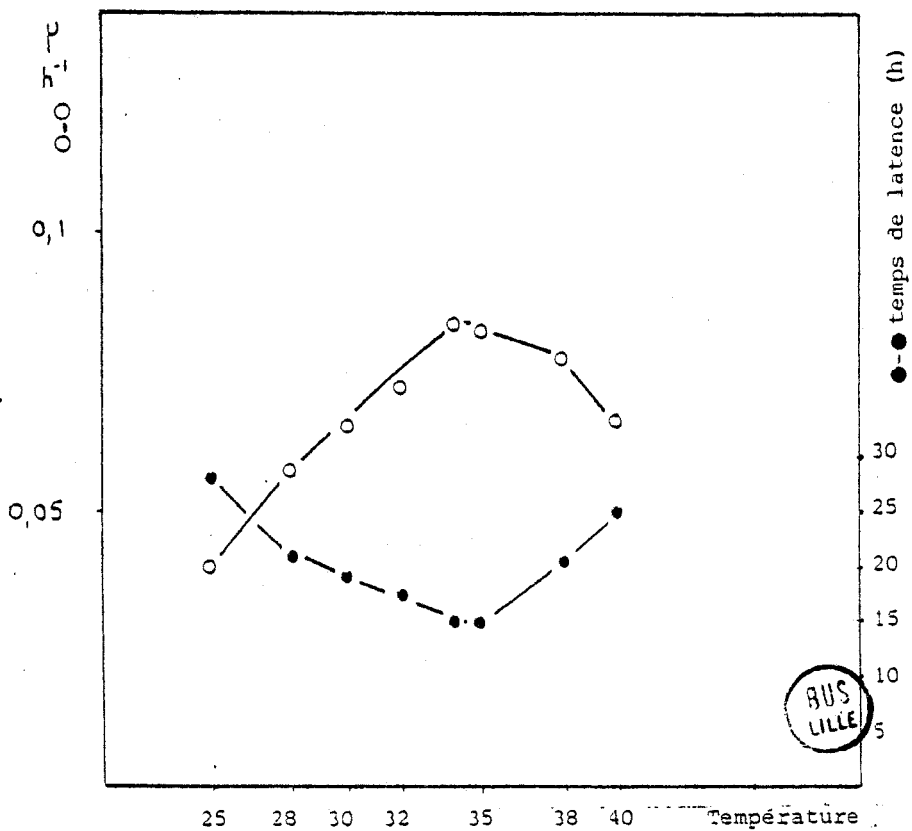


Figure 38b: Influence de la température sur le taux de croissance de la souche MC4.

BUS  
LILLE

### V - 1.3. Caractérisation cinétique

Les cinétiques de dégradation du glucose, cellobiose et cellulose (Figures N° 39 & 40) ont été réalisées en fermenteur de deux litres sur un milieu contenant 10 g/l de substrat. Le pH a été régulé à 6,6 par de la soude 5N.

#### \* Cinétique sur glucose et cellobiose

Sur glucose, et à un moindre degré sur cellobiose, on observe après un court temps de latence (3 heures), une croissance diauxique qui peut être liée à la consommation de l'extrait de levure du milieu ou à celle du substrat résiduel apporté par l'inoculum. Sur ces deux sucres, la croissance est rapide et le  $u_{max}$  est de  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , soit un temps de doublement de 3,5 heures. L'acétate est le produit majeur de la fermentation. Sur cellobiose, comparativement aux cultures sur glucose, la dégénérescence cellulaire intervient très rapidement et la production de métabolite cesse ; par contre, la production d'acétate est rapide.

#### \* Cinétique sur cellulose

Sur ce substrat, le temps de latence observé est important (environ 30 heures), l'arrêt de la fermentation intervient après 70 heures alors que la cellulose n'est pas totalement dégradée. La concentration en sucres réducteurs durant toute la fermentation est inférieure à la valeur finale de 0,4 g/l.

#### \* Bilans

Les bilans de fermentation (Tableau XVIb) sont analogues sur glucose et cellobiose avec cependant une production de lactate plus élevée sur cellobiose. Le surcroît de carbone (5 à 10%) retrouvé dans les produits de fermentation du glucose et du cellobiose peut être

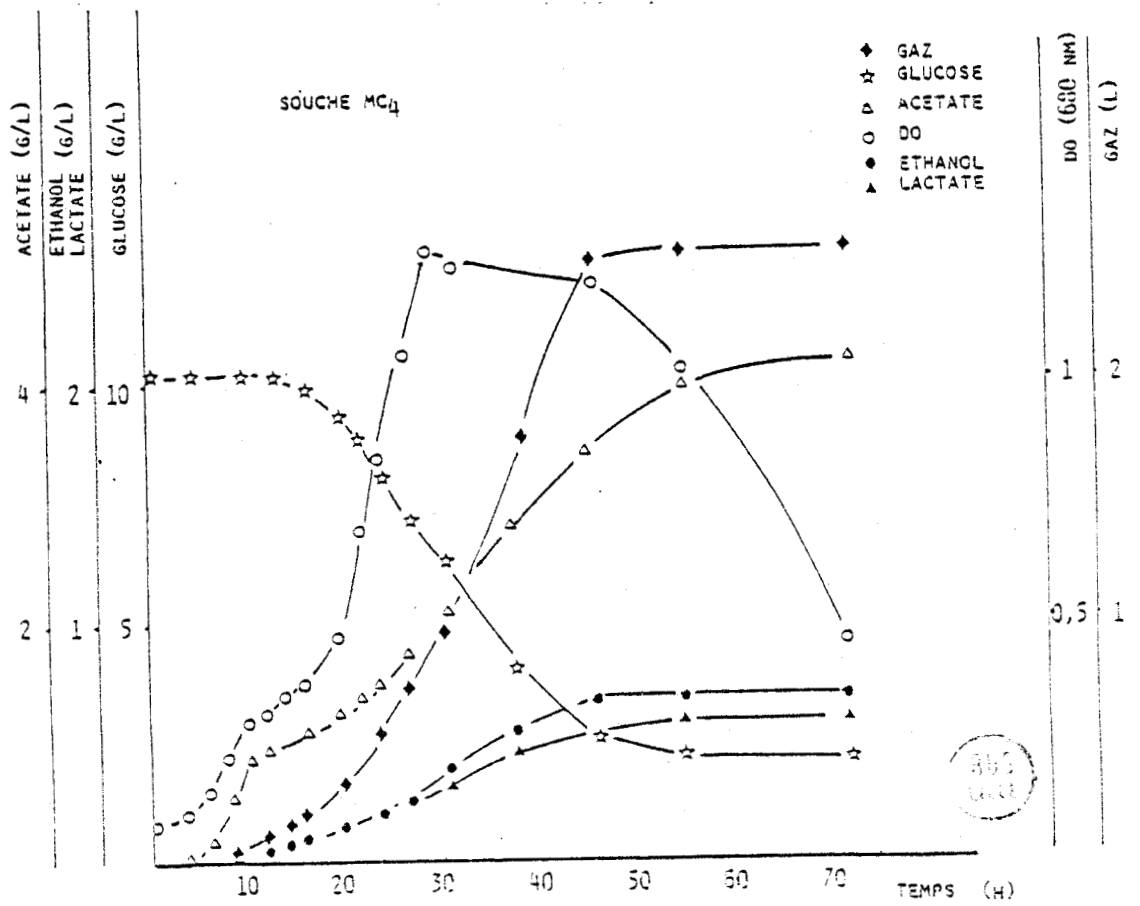
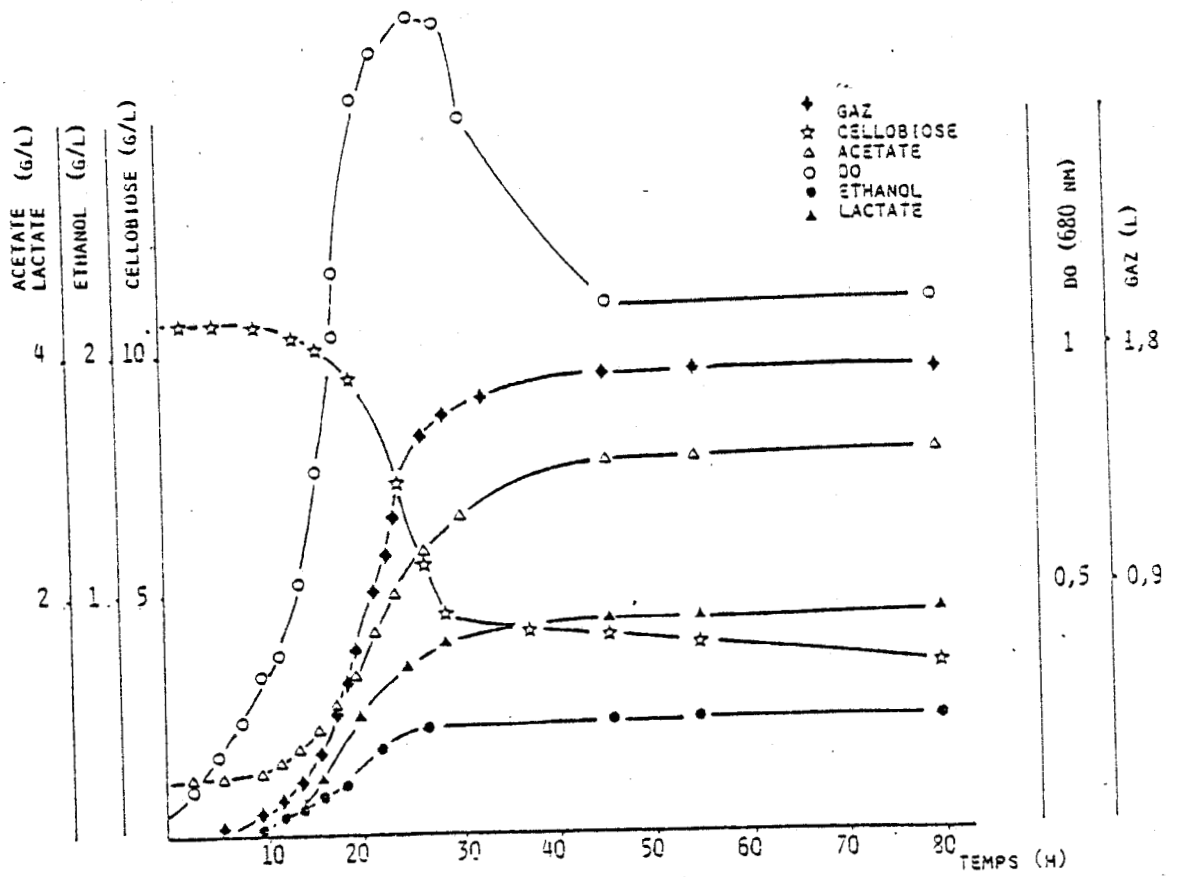


Figure 39 : Cinétiques de dégradation du cellobiose et du glucose par la souche MC<sub>4</sub>.

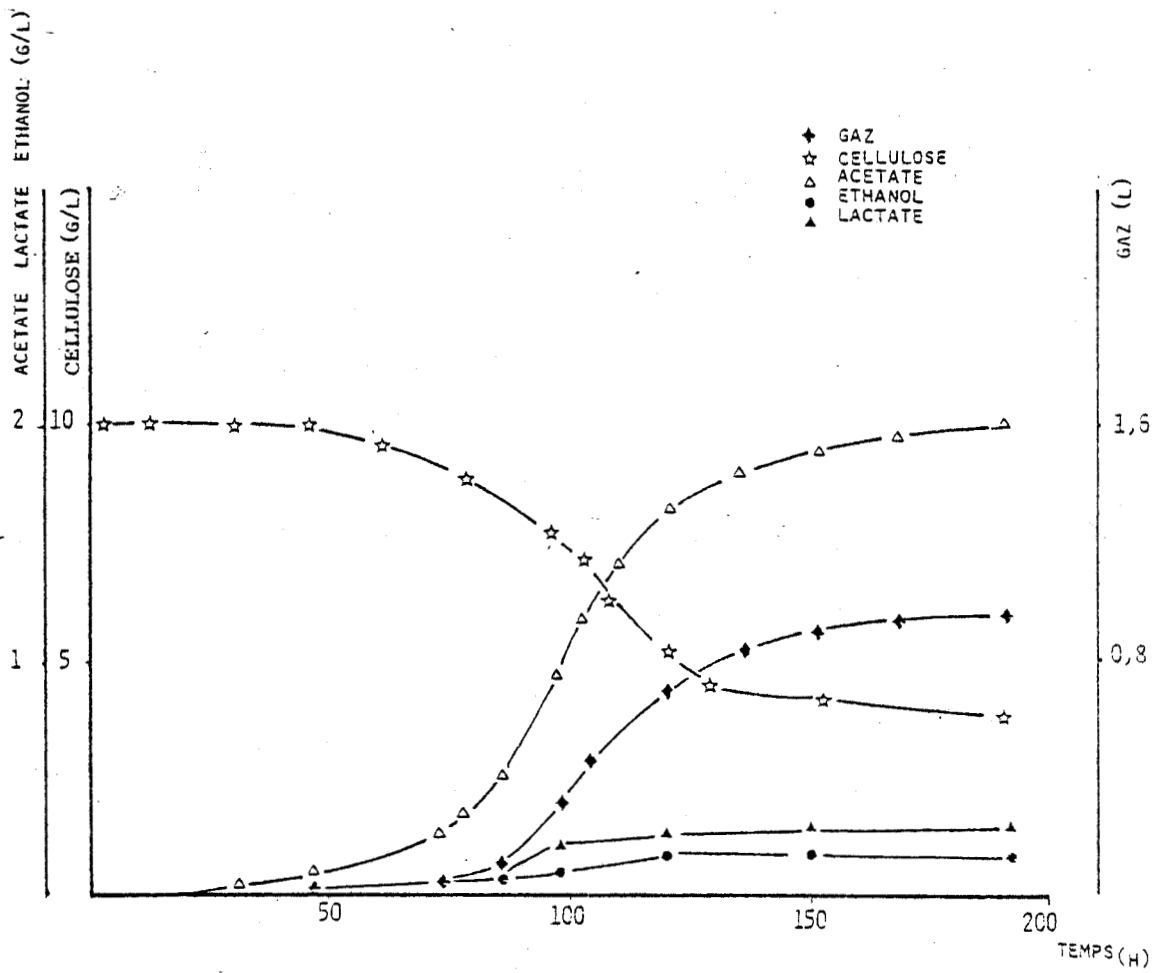


Figure 40: Cinétique de dégradation de la cellulose par la souche MC4



attribué à l'extrait de levure contenu initialement dans le milieu. Sur cellulose, le bilan carbone présente un déficit de l'ordre de 22% qui ne peut être expliqué par la biomasse formée.

#### V - 1.4. Conclusion

La souche MC4 isolée se différencie des autres Clostridia mésophiles cellulolytiques décrits dans la littérature (Clostridium cellobioparum -HUNGATE, 1966-, Clostridium papyrosolvans -MADDEN et al., 1982-) à la fois sur les plans des substrats fermentescibles et des pH optima de croissance.

Clostridium cellobioparum, contrairement à la souche MC4, fermente le fructose, le maltose et l'amidon. La souche MC4 ne fermente ni le galactose, ni le mannitol mais fermente le xylane et le mannose contrairement à Clostridium papyrosolvans.

Notre souche ressemblerait plutôt à une souche isolée très récemment (LESCHINE et al., sept. 1983) tant au niveau des substrats fermentés que de la morphologie. Toutefois contrairement à notre souche, elle ne synthétise pas de polymère extracellulaire en cours de fermentation.

L'apparition de polymère a déjà été remarqué chez d'autres souches comme Pullularia pullulans (CATLEY, 1971) et Acetivibrio cellulolyticus (PATEL et BREUIL, 1971). Chez ce dernier, le polymère est de nature polysaccharidique ; il aurait comme fonction le stockage d'énergie puisqu'il s'accumule quand le substrat énergétique est en excès et est utilisé quand il est insuffisant. Ce polymère est libéré lors de la lyse des bactéries.



Pour la souche MC4, la composition ainsi que les conditions de l'apparition du polymère restent à déterminer.

## V - 2. ASSOCIATION ENTRE LA SOUCHE MC4 ET LA SOUCHE B6

au regard des résultats obtenus précédemment, il nous a paru possible d'effectuer le couplage cellulolyse-solvantogénèse.

### V - 2.1. Essai de couplage sans addition de butyrate (Figure N° 41)

les essais ont été effectués en fermenteur de deux litres avec régulation de pH. Le couplage a été réalisé avec une inoculation décalée de la souche B6. Dans un premier temps, la souche MC4 effectue l'hydrolyse et la fermentation de la cellulose à un pH de 6,6. En 250 heures, 43% de la cellulose ont été dégradé. A la fin de cette première fermentation, il y a apparition d'une faible quantité de sucres réducteurs (0,4 g/l) ce qui démontre que les cellulases de la souche MC4 sont inhibées par le glucose ou le cellobiose libéré. Ensuite, le milieu est inoculé avec la souche de Clostridium acetobutylicum B6. Le pH est baissé artificiellement à 5,8 par l'addition d'HCl 5N. La cellulolyse reprend grâce à la levée de l'inhibition créée par les sucres réducteurs et corrélativement on remarque la production de butyrate et l'utilisation de lactate produit par la souche MC4. Cette seconde phase dure une centaine d'heures ; 8 g/l supplémentaires de cellulose sont dégradés et 6,3 g/l de butyrate sont produits avec l'apparition de petites quantités de butanol (0,6 g/l) (Tableau XVII).

Le couplage cellulolyse-solvantogénèse est donc possible mais nous n'obtenons que la phase butyrique.

Cet essai montre que Clostridium acetobutylicum est capable d'utiliser les produits résultant de l'hydrolyse de la cellulose par la souche MC4 (sucres, lactate). Cependant, le flux de glucose ou de cellobiose provenant de l'hydrolyse de la cellulose semble insuffisant pour assurer et la phase butyrique et la phase butylique (réduction du butyrate en butanol par le NADH). En conséquence, la quantité de butyrate produit étant notable, on pourrait penser que le flux de NADH dû au catabolisme des sucres pouvait être suffisant pour la production de butanol à condition de fournir à Clostridium acetobutylicum du butyrate.

V - 2.2. Essai de couplage avec addition de 6 g/l de butyrate (Figure n° 42).

Le couplage a été réalisé de la même façon que précédemment mais 6 g/l de butyrate ont été ajoutés simultanément à l'inoculation du milieu par la souche B6. On observe en même temps qu'une reprise de la cellulolyse, une utilisation du butyrate additionné (2 g/l) avec production de butanol (3,4 g/l). Après 50 heures de co-culture, la production de butanol cesse et corrélativement on observe la synthèse de butyrate. On assiste à la reprise de la production de butanol quand le butyrate atteint 7 g/l. Près de 6 g/l de butanol sont produits, la souche B6 imposant son métabolisme fermentaire, et 8 g/l de cellulose supplémentaire sont dégradées. Au bout de 305 heures, la fermentation et l'hydrolyse de la cellulose sont terminées, peut-être inhibées par la concentration en butanol du milieu (Tableau XVII).

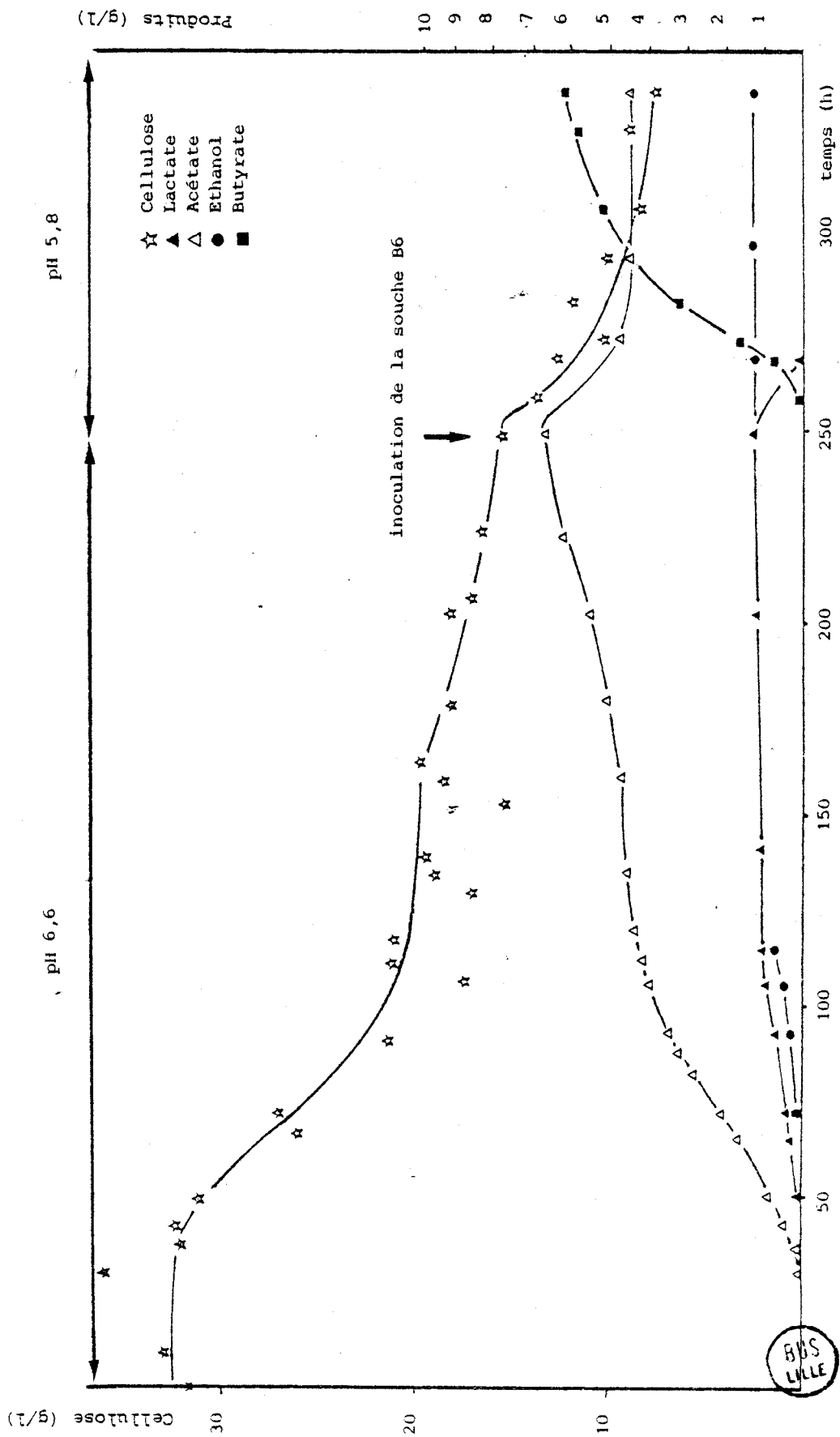


Figure 41 : Cinétique de dégradation de la cellulose et de production de métabolites sans addition de butyrate par la souche MC4 avec inoculation séquentielle de la souche B6.

BBS LILLE

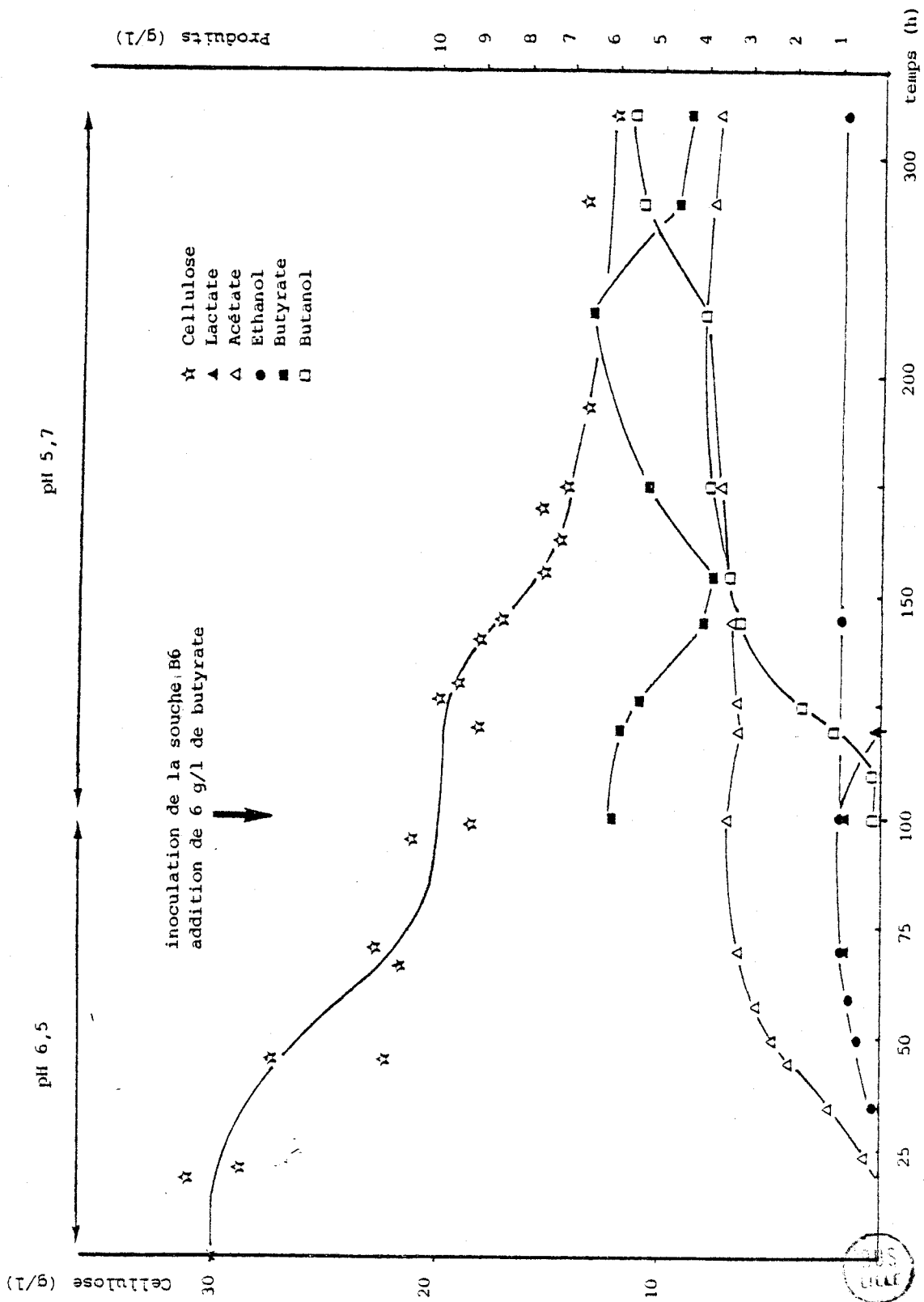


Figure 42: Cinétique de dégradation de la cellulose et de production de métabolites avec addition de butyrate (6 g/l) par la souche MC4 avec inoculation séquentielle de souche B6.

Essai sans ajout de butyrate

Cellulose dégradée g/l	Acétate g/l	Ethanol g/l	Lactate g/l	Butyrate g/l	Butanol g/l
15	6,3	1	1,25	-	-
Inoculation souche B6 8	4,5	1	0	6,3	0,6

Essai avec ajout de butyrate

Cellulose dégradée g/l	Acétate g/l	Ethanol g/l	Lactate g/l	Butyrate g/l	Butanol g/l
10	3,5	1	0,8	-	-
Inoculation souche B6 + 6 g/l Butyrate 8	3,7	1	0	4,3	5,6

Tableau XVII : Bilans de la fermentation de la cellulose par l'association *Clostridium cellulolytique* MC4 - *Clostridium acetobutylicum* B6 avec ou sans ajout de butyrate.



### V - 2.3 Conclusion

Jusqu'à présent, seul E. PETIT DEMANGE et al. (1983) avaient réussi une fermentation butyrique (production de 11 g/l de butyrate) à partir de cellulose par une association Clostridium cellulolytique-Clostridium acetobutylicum. Ces résultats, comme les nôtres (production de 6,3 g/l de butyrate) montrent la difficulté d'obtenir la phase butylique. Cela proviendrait d'un flux de sucres insuffisant pour assurer la réduction du butyrate produit. Ainsi avons-nous obtenu pour la première fois la conversion directe de cellulose en butanol grâce à l'ajout de butyrate. La quantité d'acide butyrique ajouté et le pH de culture ont permis d'atteindre la valeur seuil en acide non ionisé indiqué par MONOT (1983) induisant la solvantogénèse (comprise entre 0,6 et 1,5 g/l).

Dans ces conditions, le catabolisme des sucres résultant de la cellulolyse fournit alors l'énergie nécessaire à la croissance et les NADH produits au cours de la glycolyse sont en quantité suffisante pour permettre la réduction de butyrate en butanol.

La souche MC4 présente une bonne activité cellulolytique mais ces cellulases sont inhibées par les sucres réducteurs. Dès l'ajout de Clostridium acetobutylicum, la cellulolyse reprend. il faudrait donc disposer d'une souche non inhibée par les sucres pour espérer améliorer les performances de la co-culture.

Par ailleurs, on observe un arrêt rapide de la production de butanol. Il peut être causé soit par l'augmentation de la force ionique due à la régulation de pH (addition de NaOH) ou à l'épuisement du milieu, soit par l'inhibition des cellulases par le butanol.

Cette dernière hypothèse semble la plus vraisemblable dans la mesure où il n'y a pas de sucres réducteurs dans le milieu et que toute la cellulose n'est pas dégradée.

- C O N C L U S I O N -

-§-§-§-§-



- CONCLUSION -

Au cours de cette thèse, nous nous étions fixé trois objectifs :

- l'isolement et la sélection de nouvelles souches solvantogènes,
- l'amélioration de la tolérance au butanol des souches isolées,
- l'association entre bactéries cellulolytiques et bactéries solvantogènes.

Ceci nous a conduit tout d'abord à sélectionner à partir de différents échantillons de sols, plusieurs souches effectuant une fermentation de type acétonobutylique. Après une étude comparative, la souche 6 x BD a été retenue pour sa bonne productivité en solvants et son utilisation d'une grande variété de sucres. Cette souche présente un taux de croissance élevé à pH 5,5 ( $0,48 \text{ h}^{-1}$ ) et est capable de ré-incorporer les acides exocellulaires au cours de la phase de solvantogénèse. Nous avons alors été amenés à déterminer les conditions optimales de leur réduction en solvants. C'est ainsi que l'acétate, au delà de 10 mM, aurait plutôt un effet inhibiteur sur la production de solvants tandis que le butyrate (jusqu'à 100 mM) conduit à une augmentation de la production de butanol avec une diminution de l'utilisation des sucres.

Par une technique relativement simple (gradient de butanol), nous avons pu sélectionner un "mutant" spontané B6 à partir de la souche 6 x BD. Sa tolérance au butanol est supérieure puisque sur des cellules végétatives un taux de croissance de  $0,135 \text{ h}^{-1}$  est observé en présence de 13 g/l de butanol tandis que la souche sauvage ne présente aucune croissance. Les caractéristiques de la souche mère (utilisation d'une grande variété de sucres, incorporation des acides exocellulaires) sont maintenues ; une amélioration de 50% de la productivité en butanol est observée sur un milieu contenant 60 g/l de glucose.

En tubes, bien que nous ayons observé un effet inhibiteur additif des acides acétique et butyrique, ils n'en sont pas moins inducteurs de la solvantogénèse puisque l'on obtient près de 2 g/l de butanol dans des conditions peu favorables (sucres limitants, pH). Le mécanisme de cette stimulation n'est pas connu mais il semble que ce soit la forme non ionisée des acides dépendante à la fois du pH et de la concentration totale en acide qui en soit responsable.

L'utilisation du lactate en présence d'acétate pour la production de butyrate par la souche B6 permet d'envisager la ré-incorporation de ces acides lors du couplage hydrolyse de la cellulose-solvantogénèse. D'autre part, la cellulolyse étant l'étape limitante dans ce type de schéma, et donc pas très favorable à la production de solvants, l'ajout d'acides a rendu possible la production de butanol à partir de cellulose. Cette addition d'acides semble avoir orienté le flux d'électrons résultant de la glycolyse vers la réduction des acides fournis et la production de composés neutres. Ce schéma de co-culture avec ajout d'acides peut représenter une vue prometteuse pour

l'obtention de carburants de substitution à partir de polymères végétaux, à condition d'obtenir de bons rendements et de réaliser cette fermentation couplée en continu.

Dans cette optique, il nous a paru nécessaire d'étudier le comportement de la souche B6 vis à vis des sucres pouvant résulter de la première étape d'hydrolyse. C'est ainsi que sur mélange de sucres, le glucose est toujours le substrat préférentiel de la souche B6. Il limite l'incorporation et/ou le catabolisme du sucre co-substrat. Son addition à d'autres sucres aboutit à de meilleures productions de solvants.

L'ensemble de nos travaux contribue à une meilleure maîtrise de la physiologie de Clostridium acetobutylicum et souligne plusieurs points qui méritent d'être développés.

Si le rôle inducteur des acides, et en particulier celui du butyrate sur la production de solvants est clairement établi, il importe de montrer quelles sont les cibles et les mécanismes qui induisent finalement la solvantogénèse. De plus, il existe probablement un compromis optimal à déterminer entre l'effet inducteur du butyrate et son effet inhibiteur sur la croissance.

Le couplage entre la cellulolyse et la production de solvants n'a été possible qu'avec l'ajout de butyrate. Il importe maintenant de définir les conditions optimales de l'association, c'est à dire les concentrations en acides à ajouter en fonction du flux de sucres libérés par l'action des cellulases. En plus des facteurs classiques (pH, acide non ionisé, évolution morphologique), ce flux en conditionnant le pool de coenzymes réduits, oriente le métabolisme soit vers la production d'acides, soit vers la solvantogénèse.

Sur substrats naturels, il est évident que la source carbonée sera constituée d'un mélange de sucres incluant notamment hexoses et pentoses. Dans ces conditions, les mécanismes de transport et leurs régulations joueront un rôle essentiel dans l'amélioration des rendements. Or, chez Clostridium acetobutylicum, aucune donnée n'est actuellement disponible. Nos travaux, en montrant l'utilisation préférentielle du glucose, soulignent l'importance de nouvelles recherches sur les systèmes de transport et leurs spécificités et les régulations mises en jeu soit au niveau des protéines de transport, soit par l'intermédiaire des voies cataboliques.

Ces trois axes de recherches n'auraient probablement pas qu'un impact pratique sur la production de solvants par Clostridium acetobutylicum. Ils contribueraient plus généralement à l'extension des connaissances de la physiologie des bactéries anaérobies qui, dans de nombreux domaines, reste encore très obscure.

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

-§-§-§-§-§-§-§-

- ABOU-ZEID, A.A., FOUAD, M., YASSEIN, M. (1978)  
ZENTRAL BL. BAKT. II. 133 (2), 125-134
- ALLCOCK, E.R., REID, S.J., JONES, D.T., WOODS, D.R. (1981)  
Appl. Environ. Microbiol. 42, 929-935
- ANDERSCH, W., BAHL, H., GOTTSCHALK, G. (1982)  
Biotechnol. Lett. 4, 29-32
- AUDEN, J. et al. (1967) Path. Microbiol. 30, 858-866
- BAGHLAF, A.O., ABOU-ZEID, A.A., YASSEIN, M. (1980) Zentralbl.  
Bakteriol Parasitenkd Infektionskr. Hyg. Abt. 135, 515-522
- BAHL, H., ANDERSCH, W., BRAUN, K., GOTTSCHALK, G. (1982a)  
Eur. J. Appl Microbiol. Biotechnol. 14, 17-20
- BARBER, J.M., ROBB, F.T., WEBSTER, J.R., WOODS, D.R. (1979)  
Appl. Environ. Microbiol. 37, 433-437
- BEESCH. S.C. (1952) Indust. Eng. Chem. 44, 1677-1682
- BEESCH, S.C. (1953) Appl. Microbiol. 1, 85-95
- BEN BASSAT, A., LAMED, R., ZEIKUS, J.G. (1981)  
J. Bacteriol. 146, 192-199
- BOBICHON, L. (1981) Les limites de la voie microbiologique pour la production des  
grands intermédiaires chimiques industriels, Jan. 81, 57-62
- BUCHANAN, R.E., GIBBONS, N.E. (1974) Bergey's manual of determinative  
bacteriology. 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore.M.D.
- CALAM, C.T. (1980) Biotechnol. Letters 2, 3, 111-116

- CATLEY, B.J. (1971) Appl. Microbiol. 22, 650-654
- CHO, K.Y., DOY, C.H. (1973) J. Biol. sciences, 26, 547-558
- COMPERE, A.L., GRIFFITH, W.L. (1979) Dev. Ind. Microbiol.  
20, 509-517
- CUMMINS, C.S., JOHNSON, J.L. (1971) J. Gen. Microbiol. 67, 33-46
- DAVIES, R., STEPHENSON, M. (1941) Biochem. J. 35, 1320-1331
- DAVIES, R. (1942) Biochem. J. 36, 582-599
- DOELLE, N.H. (1975) Bacterial metabolism. New york  
Academic Press 2<sup>nd</sup> ed
- DOI, S., SUGAMA, S. (1960) C.R. Soc. Biol. 154, 1687-1690
- EBERSOLD, H.R., CORDIER, J.L., LÜTHY, P. (1981)  
Arch. Microbiol. 130,1, 19-22
- ENSLEY, B., MCHUGH, J.J., BARTON, L.L. (1975) J. Gen. Appl. Microbiol.  
21,1, 51-59
- FAN, L.T. (1982) Final report prepared for of the U.S.  
Department of energy
- FOUAD, M. (1976) Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 27, 107-117
- GAVARD, R. et al. (1957) C.H.R. Acad. Sci. 244, 2323-2326
- GEORGE, H.A., JOHNSON, J.L., MOORE, W.E.C., HOLDEMAN, L.V., CHEN, J.J.  
(1983) Appl. Environ. Microbiol. 45,3, 1160-1163
- GOTTSCHAL, J.C., MORRIS, J.G. (1981a) Biotechnol. Lett. 3, 525-530



- GOTTSCHAL, J.C., MORRIS, J.G. (1981b) FEMS Microbiol. Lett. 12, 385-389
- GOTTSCHAL, J.C., MORRIS, J.G. (1982) Biotechnol. Lett. 4, 477-482
- GOTTSCHALK, G. (1979) In "Bacterial Metabolism" ed. Springer Verlag
- GOTTSCHALK, G., BAHL, H. (1981) In trends in biology of Fermentation for fuels and chemicals (Basic Life Sciences 18), Hollaender, A. (ed), Plenum Press, New York, 463-471
- GOTTSCHALK, G. et al. (1981) in "The Prokaryotes" Ed. Springer Verlag II, 1767-1803
- HÄGGSTRÖM, L., MOLIN, N. (1980) Biotechnol. Lett. 2, 241-246
- HÄGGSTRÖM, L. (1981) in "Int. Term. Symp. Adv. Biotechnol." Pergamon Press, TORONTO 2, 79-83
- HÄGGSTRÖM, L., ENFORS, S.O. (1982) Appl. Biochem. Biotechnol. 7, 35-37
- HASTINGS, J.H. (1978) in "Economic Microbiology" 2, 31-45, ed. ROSE A.H., Academic Press, London
- HOLDEMAN, L.V., CATO, E.P., MOORE, W.E.C. (1977) Anaerobe Laboratory Manual 4th edition. Edited by the V.P.I. Anaerobe Laboratory, BLACKSBURG, Virginia 24061
- HUNGATE, R.E. (1966) The rumen and its microbes. Academic Press, inc New York
- HONG, B., SHIN, K.C., FAN, L.T. (1981) Proc. Midwest. Biochem. Symposium.



- JONES, P.T., WEBSTER, J.R., WOODS, D.R. (1980) J. Gen. Microbiol  
116, 195-200
- JONES, D.T., VAN der WESTHUIZEN, A., LONG, S., ALLCOCK, E.R. REID, S.J.,  
WOODS, D.R. (1982) Appl. Environ. Microbiol. 43, 1434-1439
- JUNGERMANN, K., RUPPRECHT, E., OHRLOFF, C., THAUER, R.K., DECKER, K.  
(1971) J. Biol. Chem. 246, 960-963
- JUNGERMANN, K., THAUER, R.K., LIMENSTOLL, G., DECKER, K. (1973)  
Biochim. Biophys. Acta 305, 268-280
- JUNGERMAN, K. et al. (1975) Microbiol production and utilization of  
gazes - GÖTTINGEN
- KAISER, P. (1982) colloque Société Franc. de Microbiol. IFP Rueil-Malmaison
- KEPES, A. (1978) Aspects moléculaires des fonctions membranaires - Ed. Masson
- KUTZNER, H.J. (1963) Infect. Hyg. Abt., 191 (1), 441-450
- LANGLYKKE, A.F., VAN LANEN, J.M., FRASER, D.R. (1948)  
Ind. Eng. Chem. 40, 1716-1719
- LESCHINE, S.R., CANALE-PAROLA, E. (1983) Appl. Environ. Microbiol.  
46 (3) 728-737
- MAC COY, E., FRED, E.B., PETERSON, W.H., HASTINGS, E.G. (1926)  
J. Infect. Dis. 39, 457-483
- MADDEN, R.H., BRYDER, M.J., POOLE, N.J. (1982) Int. J. of Syst.  
Bacteriol., 326, 87-91

- MADDOX, I.S. (1980) *Biotechnol. Lett.*, 2,11, 493-498
- MADDOX, I.S. (1982) *Biotechnol. Lett.* 4, 23-28
- MADDOX, I.S. (1982) *Biotechnol. Lett.* 4,11, 759-760
- MADDOX, I.S., MURRAY, E.A. (1983) *Biotechnol. Lett.* 5,3, 175-178
- MAHMOUD, S.A.Z., TAHA, S.M., ISHAC, Y.Z., EL-SAWY, M., EL-DEMERDASH, M.E.  
(1974) *Egypt. J. Microbiol.* 9, 45-56
- MARTIN, J.R., PETITDEMANGE, H., BALLONGUE, J., GAY, R. (1983)  
*Biotech. Lett.* 5,2, 89-94
- MES-HARTREE, M., SADDLER, J.N. (1982) *Biotechnol. Lett.* 4, 247-252
- MILLER, T.L., WOLIN, M.J. (1973) *Appl. Microbiol.* 27, 985-987
- MISHUTIN, E.N., YEMTSEV, V.T. (1973) *Soil. Biol. Biochem.* 5, 97-107
- MITCHELL, P. (1976) *Biochem. Soc. Trans.* 4, 399
- MONOD, J. (1949) *Annual Review of Microbiology*, 3, 371
- MONOT, F., MARTIN, J.R., PETITDEMANGE, H., GAY, R. (1982) *Appl. and  
Envi. Microbiol.* 44, 1318-1324
- MONOT, F. (1983) *Thèse de docteur-ingénieur INPL - NANCY*
- MOLETTA, R., ALBAGNAC, G. (1982) *Biotech. Lett.* 4 (5), 319-322
- MOREIRA, A.R., DALE, B.E., DOREMUS, M.G. (1982) *Biotech. Bioeng.  
Symp.* 12, 263-277
- MOREIRA, A.R., ULMER, D.C., LINDEN, J.C. (1981) *Biotech. Bioeng.  
Symp.* 11, 567-579

- MORTENSON, L.E., VALENTINE, R.C., CARNAHAN, J.E. (1963)  
J. Biol. Chem. 238, 794-800
- NAKHMANOVICK, B.M., SCHEBLYKINA, N.A. (1959) Microbiologiya, T 28, p. 104
- NG, T.K. et al. (1981) Appl. Environ. Microbiol. 41, 6, 1337-1343
- NG, T.K., ZEIKUS, J.G. (1981) Appl. Environ. Microbiol. 42, 2, 232-240
- O'BRIEN, R.W., MORRIS, J.G. (1971) J. Gen. Microbiol. 68, 307-318
- OXFORD, A.E., LAMPEN, J.O., PETERSON, W.H. (1940) Biochem. J.  
34, 1588-1597
- PASTEUR, L. (1862) Bull. Soc. Chim. FR. 52-53
- PATEL, G.B., BREUIL, C; (1981) Arch. Microbiol. 129, 265-267
- PETERSON, W.H., FRED, E.B. (1932) Ind. Eng. Chem. (1932)  
24, 237-242
- PETIT DEMANGE, E., FOND, O., CAILLET, F., PETIT DEMANGE, H., GAY, R.  
(1983) Biotech. Lett., 5 (2), 119-124
- PETIT DEMANGE, H. et al. (1970) C.R. Acad. Sc. PARIS t 270, Série D,  
199-202
- PETIT DEMANGE, H. , BELLANGER, M., LAMBERT, D., GAY, R. (1971)  
C.R. Acad. Sc. PARIS 272, 2840-2843
- PETIT DEMANGE, H., CHERRIER, C., RAVAL, G., GAY, R. (1976)  
Biochim. Biophys. Acta. 421, 334-347
- PETIT DEMANGE, H., MARCZAK, R., BLUSSON, H., GAY, R. (1979)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 91, 1258-1265

PIMPA, P. (1983) Thèse de docteur-ingénieur - université de TOULOUSE

POMAR, F.T. (1977) Dev. Ind. Microbiol. 20, 509-517

PRESCOTT, S.C., DUNN, C.G. (1959) In "Industrial Microbiology"  
3rd ed., pp 250-284 NEW YORK, Mc Graw-Hill Book Co

REHM, H.J., REED, G. (1981) Biotechnology - Vol. 1 - Microbial  
fundamentals

REYES-TEODORA, R., MICKELSON, M.N. (1945) Arch. Biochem. 6, 471-477

ROSS, D. (1961) Prog. Ind. Microbiol. 3, 71-90

ROSS, D. (1961) In "Progress in industrial microbiology".  
3, 73-88. Ed. Hockenhull D., HEYMOOD, LONDON

RUBBO, D. et al. (1941) Austral. J. Experim. Biol. Med. 19, 185-197

SADDLER, J.N., YU, K.C.E., MES-HARTREE, M., LEVITIN, N., BROWNELL, H.H.  
(1983) Appl. Environ. Microbiol. 45,1, 153-160

SAIER, M.H. (1977) Bact. Rev. 41,4, 856-871

SEBALD, M., FAYOLLE, F. (1982) Colloque ann. Société Franc. Microbiol.  
IFP - Rueil-Malmaison

SONI, B.K., DAS, K., GHOSE, J.K. (1982) Biotechnol. Letters 4,1, 19-22

SPIVEY, M.J. (1978) Process Biochem. 13, 2-4, 25

STEEL, R. (1958) In "Biochemical engineering : unit processes in  
fermentation". Mac MILLAN, N.Y. 125-148

- TATUM, E.L. et al. (1935) J. Bact. 29, 6, 563-572
- THAUER, R.K. et al. (1969) FEBS Lett. 4, 108-112
- THAUER, R.K., JUNGERMANN, K., DECKER, K. (1977) Bacteriol.  
Rev. 41, 100-180
- TUCKEY, J., OUJESKY, H. (1976) Dev. Ind. Microbiol., 17, 387
- TUCKEY, J., OUJESKY, H. (1978) Dev. Ind. Microbiol., 91, 283
- TWAROG, R., WOLFE, R.S (1962) J. Biol. Chem. 237, 2374
- UNDERKOFFLER, L.A., CHRISTENSEN, L.M., FULMER, E.I. (1936)  
Ind. Eng. Chem. 3, 350-354
- VALENTINE, R.C., WOLFE, R.S. (1960) J. Biol. Chem. 235, 1948-1952
- VAN de CASTEELE, J.P. (1982) Colloque Société Franc. Microbiol.  
IFP - Rueil-Malmaison
- Van der WESTHUIZEN, A., JONES, D.T., WOODS, D.R. (1982)  
Appl. Environ. Microbiol. 44, 1277-1281
- VERGNAUD, P. (1967) Chimie Industrie - Génie Chimique, 98 (1), 23-33
- VOLESKY, B., SZCZESNY, T. (1983) Adv. Biochem. Engen. Biotech.  
27, 101-116 Ed Fiechter
- WALTON, M.T., MARTIN, J.L. (1979) Microbial Technology, 2nd ed.,  
vol. 1, 187-209
- WANG, Dic. (1981) 2nd World Congress of Chemical Engineering  
Montreal, oct. 4-9 - Cité par MONOT (1983)

WEBSTER, J.C., REID, S.J., JONES, D.T., WOODS, D.R. (1981)  
Appl. Environ. Microbiol. 41, 371-374

WENDLAND, R.T., FULMER, E.I., UNDERKOFFLER, L.A. (1941)  
Ind. Eng. Chem. 33, 1078-1081

WEYER et RETTGER (1927) J. Bact. 14, 399-424

WOOD, H.G., BROWN, R.W., WERKMAN, C.H. (1945) Arch. Biochem.  
6, 243-260

WOOD, W.A. (1961) In "The Bacteria". Tome II. ch. II. Academic Press  
pp 59-84

YU LONG LIN, BLASCHEK, H.P. (1983) Appl. Environ. Microbiol.  
45 (3) 966-973

ZEIKUS, J.G., WOLFE, R.S. (1972) J. Bacteriol. 109, 707-713

