

50376  
1984  
129

50376  
1984  
129

N° d'ordre 343

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR - INGENIEUR  
en Biologie et Physiologie Végétale

Pascale LE RUYET

HYDROLYSE ET FERMENTATION DES POLYOSIDES VEGETAUX PAR LES BACTERIES  
ANAEROBIES

Isolement, caractérisation et étude physiologique de nouvelles espèces  
cellulolytiques et xylanolytiques



Soutenue le 17 Mai 1984 devant la Commission d'Examen

Jury

Président : Monsieur GUILLAUME  
Rapporteurs : Messieurs ALBAGNAC  
TAILLIEZ  
Examineurs : Messieurs RIVIERE  
PAPOZ

SCD LILLE 1



D 030 321102 1

50376  
1984  
129

à Michel  
et à mes parents

"On prouve tout ce qu'on veut  
et la vraie difficulté est de savoir  
ce qu'on veut prouver"

ALAIN

Je tiens à remercier tout particulièrement :

- Monsieur G. ALBAGNAC, Directeur de la Station de Technologie Alimentaire, qui m'a intégrée dans son équipe de l'I.N.R.A. de VILLENEUVE D'ASCQ et m'a toujours encouragée et conseillée,

- Monsieur H.C. DUBOURGUIER, Chargé de Recherches à l'I.N.R.A., qui m'a dirigée dans mon travail

- Monsieur J. GUILLAUME, Professeur à l'Université de LILLE I, qui a accepté de présider mon jury de thèse,

- Monsieur F. TAILLIEZ, Professeur à l'Université de LILLE I, Monsieur RIVIERE, Professeur à l'Institut National d'Agronomie de PARIS, Monsieur PAPOZ, Directeur Départemental de l'Agriculture, qui ont accepté de participer à mon jury en raison de leur intérêt pour l'hydrolyse et les fermentations bactériennes,

- l'AGENCE FRANCAISE POUR LA MAITRISE DE L'ENERGIE, qui en m'allouant une bourse, m'a permis de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont d'autre part à :

- C. ALBAGNAC, M. LOONIS et J.P. LEPOUTRE que j'ai souvent mis à contribution,

- R. MOLETTA, J.P. TOUZEL, D. VERRIER, E. SAMAIN, J. JACQUEMONT, J.F. MIGDAL, F. FONTAINE et C. VASSEUR qui m'ont amicalement fait part de leur expérience personnelle

et tous ceux que je n'ai pas cités et qui m'ont supportée pendant près de trois ans.

- PLAN -

-\*-

- INTRODUCTION -

- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE -

INTRODUCTION	4.-
<u>I.- HYDROLYSE DE LA CELLULOSE ET DES XYLANES</u>	6.-
A.- Hydrolyse de la cellulose	6.-
A.1.- Structure de la cellulose	6.-
A.2.- Les principales espèces anaérobies cellulolytiques	7.-
A.3.- L'hydrolyse enzymatique de la cellulose	7.-
A.4.- Caractéristiques des cellulases bactériennes et comparaison avec les cellulases fongiques	9.-
A.4.1.- Caractéristiques	9.-
A.4.2.- Induction et répression des cellulases	10.-
B.- Hydrolyse des xylanes	11.-
B.1.- Les xylanes	11.-
B.2.- Hydrolyse enzymatique des xylanes	11.-
<u>II.- FERMENTATION DES OSES CHEZ LES BACTERIES ANAEROBIES</u>	14.-
A.- Les différentes voies d'attaque des oses et les enzymes caractéristiques	14.-
A.1.- La voie d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS	14.-
A.2.- La voie des hexoses monophosphate	14.-
A.3.- La voie de la phosphocétolase	15.-
A.4.- La voie d'ENTNER-DOUDOROFF	15.-
B.- La décarboxylation du pyruvate	15.-
B.1.- La réaction phosphoroclastique	15.-
B.2.- La réaction thioclastique	17.-
B.3.- La pyruvate décarboxylase	17.-
C.- Les voies de production de métabolites et leur régulation	18.-
C.1.- La production de lactate	18.-
C.1.1.- Les voies de production de lactate	18.-
C.1.2.- La régulation de la LDH	19.-
C.1.3.- Fermentation des pentoses	21.-
C.2.- Production d'éthanol	22.-
C.3.- Production de butyrate	23.-
C.4.- Production de succinate et de propionate	24.-
C.5.- Production d'acétate	25.-
<u>III.- INTERACTIONS BACTERIENNES</u>	27.-
A.- Interactions nutritionnelles	27.-
B.- Transfert d'hydrogène inter-espèces	28.-
CONCLUSIONS	30.-

- MATERIELS ET METHODES -

<u>I.- MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURE</u>	31.-
<u>II.- ENRICHISSEMENTS ET ORIGINE DES INOCULA</u>	31.-
<u>III.- SUBSTRATS</u>	32.-
<u>IV.- METHODES ANALYTIQUES</u>	32.-
<u>V.- HYDROLYSE DES POLYSACCHARIDES</u>	34.-
<u>VI.- DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES</u>	34.-
<u>VII.- ISOLEMENT DE L'A.D.N.</u>	35.-
<u>VIII.- MICROSCOPIE OPTIQUE ET ELECTRONIQUE</u>	35.-
<u>IX.- ELECTROPHORESE DES PROTEINES BACTERIENNES</u>	36.-
<u>X.- DENOMBREMENTS BACTERIENS</u>	37.-
<u>XI.- SOUCHES DE REFERENCE</u>	37.-

- RESULTATS ET DISCUSSION -

1ERE PARTIE

ETUDES ECOLOGIQUE ET CINETIQUE DES POPULATIONS ADAPTEES MESOPHILES ET THERMOPHILES

COMPOSITION DES SUBSTRATS UTILISES	38.-
<u>I.- DENOMBREMENTS DE LA FLORE HYDROLYTIQUE DANS DES DIGESTEURS MESOPHILES ET THERMOPHILES</u>	39.-
<u>II.- DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR DES POPULATIONS ADAPTEES</u>	41.-
A.- Dégradation de la cellulose par des cultures d'enrichissements mésophiles	41.-
B.- Dégradation de la cellulose par des cultures d'enrichissements thermophiles	42.-
<u>III.- ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES HYDROLYTIQUES</u>	43.-
A.- Groupage des isolats mésophiles	44.-
B.- Groupage et caractérisation des isolats hydrolytiques thermophiles	44.-
B.1.- Groupe I	45.-
B.2.- Groupe 2	45.-
B.3.- Groupe 3	46.-
DISCUSSION - CONCLUSIONS	47.-

2EME PARTIE  
TAXONOMIE ET PHYSIOLOGIE DES PRINCIPAUX ISOLATS HYDROLYTIQUES MESOPHILES ET THERMOPHILES

<u>I.- ETUDE DE LA SOUCHE MESOPHILE CELLULOLYTIQUE :</u>	
<u>Clostridium sp. MC 4</u>	52.-
A.- Colonies et morphologie	52.-
B.- Croissance et besoins nutritionnels	52.-
C.- Cinétiques et bilans de fermentation	53.-
C.1.- Fermentations du glucose et du cellobiose	53.-
C.2.- Inhibition de la croissance de la souche MC 4 par l'hydrogène	54.-
C.3.- Fermentation de la cellulose	54.-
D.- Discussion - conclusions	55.-
<u>II.- ETUDE DE C. thermocellum SOUCHE TC 11</u>	58.-
A.- Colonies et morphologie	58.-
B.- Conditions de croissance	59.-
C.- Comparaison des profils électrophorétiques des protéines des différentes souches de C. thermocellum	59.-
D.- Produits et bilans de fermentation de C. thermocellum TC 11	60.-
D.1.- En culture discontinue à pH non régulé	60.-
D.2.- A pH régulé	60.-
D.3.- Activités cellulases	61.-
D.4.- En fonction de la concentration en cellulose	61.-
E.- Discussion et conclusions	62.-
<u>III.- ETUDE DE DEUX SOUCHES XYLANOLYTIQUES THERMOPHILES :</u>	
<u>Clostridium sp. TC 21 et TX 41</u>	65.-
A.- Colonies et morphologie	65.-
B.- Etude électrophorétique des protéines cellulaires	66.-
C.- Croissance et besoins nutritionnels	66.-
D.- Cinétiques et bilans de fermentation par Clostridium sp. TC 21	67.-
D.1.- Fermentation du glucose et du xylose	67.-
D.2.- Fermentation de l'amidon et du xylane	68.-
D.3.- Fermentation de la cellulose	69.-
E.- Cinétiques et bilans de fermentation par Clostridium sp. TC 41	70.-
E.1.- Fermentation du glucose et du xylose	70.-
E.2.- Fermentation de l'amidon	70.-
F.- Discussion et conclusion	70.-

3EME PARTIE  
INFLUENCE DES COCULTURES SUR LES CINÉTIQUES ET LES BILANS DE FERMENTATION

<u>I.- INFLUENCE DE LA COCULTURE AVEC UNE BACTERIE HYDROGENOPHILE</u>	75.-
A.- Influence du transfert inter-espèces d'hydrogène sur le métabolisme de la souche mésophile MC 4	75.-
B.- Influence de la coculture avec une bactérie méthanogène sur les cinétiques et les bilans de fermentation des souches thermophiles	76.-

II.- INFLUENCE DE LA COCULTURE DE C. thermocellum (souche TC 11) ET DE C. thermocellum (souche TC 21) SUR LA FERMENTATION DE LA CELLULOSE 77.-

III.- INFLUENCE DE LA COCULTURE DE C. thermocellum AVEC UNE SOUCHE HYDROGENOPHILE ET FERMENTATIVE HOMOACETOGENE 79.-

DISCUSSION - CONCLUSIONS 80.-

- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES -

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

- ANNEXE -

INTRODUCTION

~~\*\*\*~~



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

-\*-\*-\*-\*

Les polymères pariétaux sont représentés essentiellement par la cellulose (jusqu'à 60%), les hémicelluloses et les pectines (jusqu'à 30%) et les lignines (jusqu'à 30%). Ces composés constituent une source de carbone abondante et renouvelable. Or, actuellement 0,2% seulement de cette production est valorisé dans l'industrie (CHARTIER et DUPUY, 1978).

Dans le cas des déchets municipaux ou d'industries agro-alimentaires, le recyclage par fermentation méthanique semble la solution la plus économiquement intéressante, à plus ou moins long terme, dans le contexte actuel de crise énergétique.

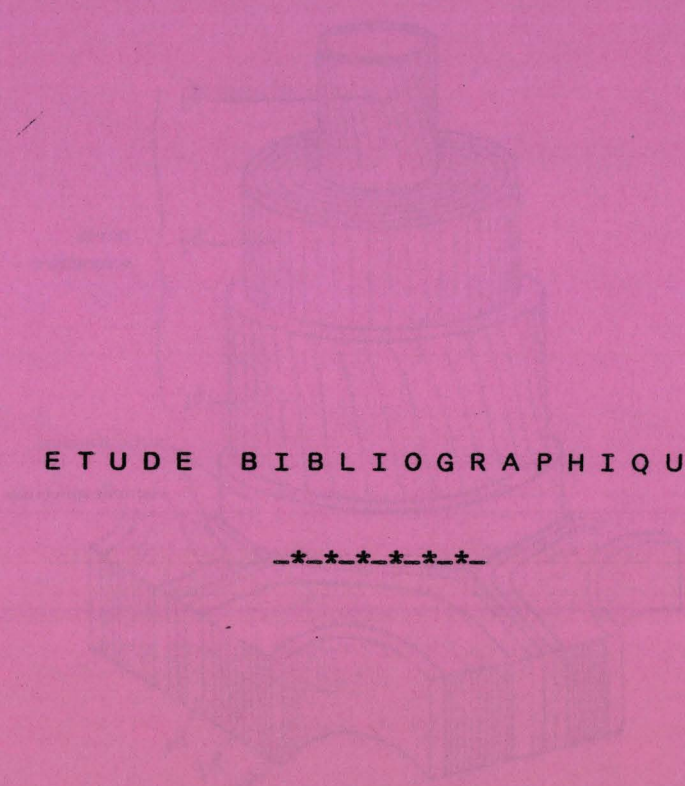
Mais, à côté de ce recyclage de type énergétique, les polymères végétaux peuvent représenter une source importante pour la production d'enzymes, d'acides organiques, d'alcools ou de solvants. Pour ces trois derniers types de produits les biomasses viendraient donc en remplacement d'une partie au moins du pétrole, soit par l'utilisation de la voie thermo-chimique (pyrolyse et gazéification ou hydrolyse chimique), soit par utilisation de la filière "voie humide" pour les biomasses peu lignifiées à forte teneur en eau ou riches en glucides facilement hydrolysables.

Les traitements thermo-chimiques ou physico-chimiques des polymères végétaux sont nombreux (PALZ et al., 1981) et se font avec des rendements de 60 à 95%. Ces traitements se traduisent par une production de sucres (xylose, arabinose et glucose) et d'acétate. Mais ces procédés induisent souvent (jusqu'à 30%) une dégradation partielle du glucose et du xylose en hydroxyfurfural et furfural (GHOSE et GHOSH, 1978). Ces composés sont très toxiques pour les micro-organismes.

De ce fait, de nombreux auteurs se sont attachés à l'étude de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse (MANDELS et al., 1974 ; AUNSTRUP, 1979 ; MANDELS et al., 1981) et au couplage de l'hydrolyse et de la fermentation en métabolites intéressants pour l'industrie (SUNDSTROM et KLEI, 1982 ; SADDLER et al., 1982 a ; JERGER et al.,

Etant donné le faible nombre de bactéries hydrolytiques connues, j'ai alors orienté ma thématique selon trois grands axes :

- isolement et caractérisation de souches cellulolytiques, xylanolytiques et amylolytiques
- étude physiologique des nouvelles souches isolées
- l'association de ces souches pour former des cultures stables, complémentaires, en vue d'une dégradation efficace des polymères végétaux.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

\*\*\*\*\*

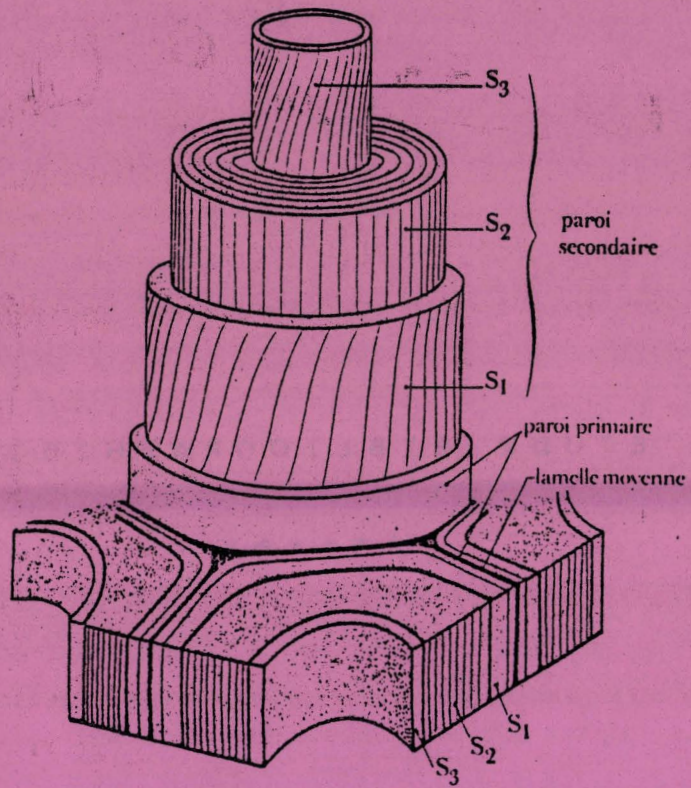


Fig. 1 – Vue perspective d'une paroi disséquée montrant les différents niveaux.

## INTRODUCTION

-\*-

L'attaque bactérienne des résidus solides suppose la dégradation d'une grande variété de polymères associés à la paroi végétale.

Classiquement, on distingue : la cellulose (homopolymères de résidus anhydroglucose liés en  $\beta$  1,4), les hémicelluloses (hétéropolymères d'hexoses et pentoses à la composition chimique très variable), les pectines (polymères d'acides uroniques) et enfin la lignine. Cette dernière, de nature polyphénolique, est indépolymérisable en anaérobiose (ZEIKUS, 1980 b ; ODIER et MONTIES, 1983) bien que l'on connaisse des associations bactériennes capables de transformer en méthane les acides phénoliques substitués (HEALY et al., 1980 ; COLBERG et YOUNG, 1982 ; SCHINK et PFENNIG, 1982).

Ces différents polymères présentent une localisation typique au sein de la paroi végétale (figure 1). En ce qui concerne leur structure, il existe des synthèses bibliographiques récentes (ASPINALL, 1970 ; FAN et al., 1980 ; WORTH, 1967 ; KENNETH et WILKIE, 1979 ; WOOD, 1970). Nous nous bornerons simplement à rappeler les principales caractéristiques des composés qui ont fait l'objet de nos travaux expérimentaux (cellulose et xylane).

Il est manifeste que parmi les micro-organismes capables de dégrader la cellulose, les champignons (Sporotrichum pulverulentum, Trichoderma viride et Trichoderma reesei) et les bactéries anaérobies facultatives ou aérobies strictes (Serratia marcescens, Pseudomonas fluorescens, Cellulomonas sp. etc ...) ont été les plus étudiés (NORKAN, 1967 ; GHOSE, 1977 ; LUTZEN et al., 1983 ; MANDELS et WEBER, 1969 ; RYU et MANDELS, 1980 ; HALLIWELL, 1979). T. viride et T. reesei sont actuellement les meilleures sources de cellulases industrielles (SADDLER, 1982 ; LADISCH et al., 1983) et plusieurs auteurs envisagent de les utiliser dans l'hydrolyse enzymatique des polymères végétaux (GALLO et al., 1980 ; GUPTA et al., 1973 ; ALLEN et ANDREOTTI, 1982). Récemment, des Actinomycètes ont été décrits comme ayant de fortes activités cellulosiques : Thermomonospora curvata (STUTZENBERGER, 1979) et Talaromycetes sp. (SU et PAULAVICIUS, 1975 ; NISHIO et al., 1981).

L'étude de l'hydrolyse des substrats ligno-cellulosiques dans les écosystèmes anaérobies n'a débuté qu'à partir de 1950 grâce aux travaux de HUNGATE. La technique particulière mise au point pour l'étude de la cellulolyse dans le rumen, les techniques dérivées (BRYANT, 1972 ; MILLER et WOLIN, 1973 b) et la technique des chambres anaérobies (ARANKI et FRETER, 1969 ; LEACH et al., 1971) ont été appliquées à d'autres écosystèmes anaérobies mésophiles (IANNOTTI et al., 1982 ; TOERIEN et HATTING, 1969 ; HOBSON et SHAW, 1974) et anaérobies thermophiles (LANGWORTHY et al., 1979 ; BROCK, 1967).

L'intérêt actuel porté aux bactéries thermophiles est motivé par leurs avantages potentiels en biotechnologie et pour la valorisation énergétique des résidus (SCHARER et MOO-YOUNG, 1979 ; ZEIKUS, 1979 ; SHELEF et al., 1980 ; WISE et al., 1978). Par rapport à leurs homologues mésophiles, elles présentent en effet les principaux avantages suivants : un faible risque de contamination des procédés, un spectre fermentaire plus restreint, une fermentation plus rapide (due à une activité métabolique plus élevée) et une différence faible entre température de fermentation et température de distillation des solvants. Cette dernière particularité permet la mise en place de procédés de fermentation couplés à une distillation en continu des métabolites, et donc à priori de lever l'inhibition par les produits de réactions.

De plus, l'étude des relations trophiques au sein des écosystèmes anaérobies a démontré l'intérêt des cocultures pour obtenir un meilleur rendement de conversion du substrat ou pour orienter la fermentation vers un métabolite particulier (WOLIN, 1979).

Dans cette synthèse bibliographique, je m'attacherai donc à faire le point sur l'hydrolyse bactérienne, en anaérobiose, des polymères parietaux, et à préciser les avantages et les limitations de ces microorganismes par rapport aux champignons. Les interactions bactériennes seront essentiellement discutées à la lumière des résultats acquis sur des associations modèles réalisées à partir de souches mésophiles ou thermophiles.

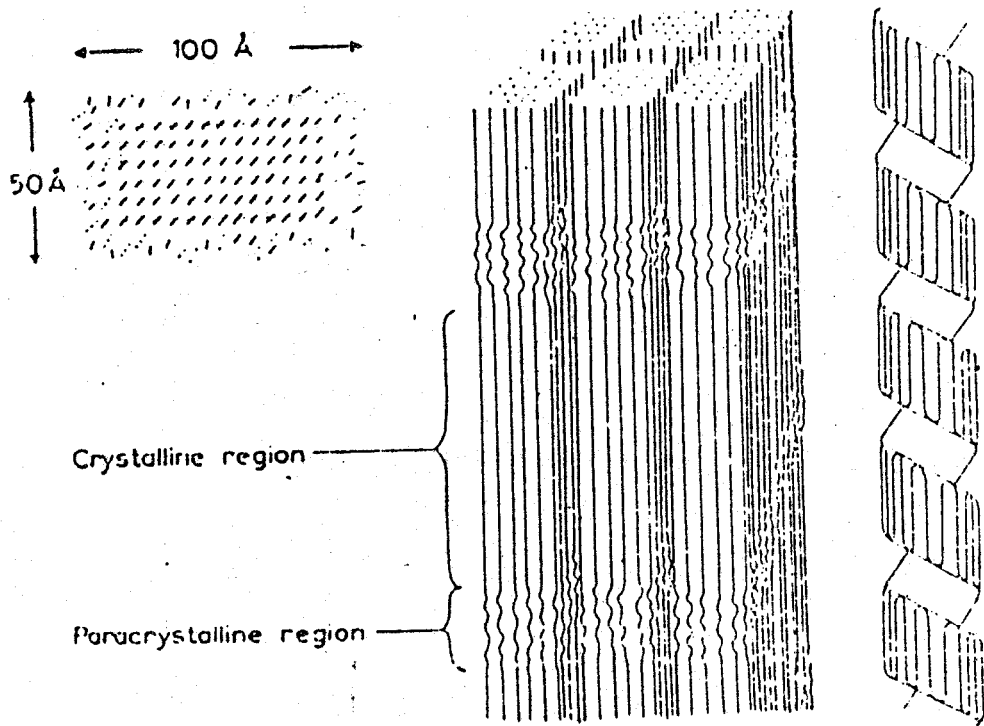


FIGURE n° 2 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE MICROFIBRILLES  
DE CELLULOSE -

## I.- HYDROLYSE DE LA CELLULOSE ET DES XYLANES

L'hydrolyse des polymères végétaux est réalisée sous l'action synergique de trois groupes d'enzymes: des endo-hydrolases, des exo-hydrolases et des glycosidases.

Ce schéma est vrai dans le cas des homopolymères linéaires (cellulose et amylose). Dans le cas des homopolymères ramifiés (amylopectine), il intervient également des enzymes débranchantes. Enfin, dans le cas des hétéropolymères (xylanes) constitués par un squelette principal et des ramifications de faibles longueurs, l'action préalable de glycosidases (arabino furanosidase et glucuronidase) est souvent un préliminaire indispensable avant la dégradation de la chaîne principale.

### A.- HYDROLYSE DE LA CELLULOSE

#### A.1.- Structure de la cellulose:

La cellulose est un polymère non ramifié de  $\beta$  1,4 D-glucoses assemblés sous forme de microfibrilles, par des liaisons hydrogènes, et caractérisé par deux zones distinctes (figure 2). Une zone cristalline où les microfibrilles sont parfaitement ordonnées et une zone amorphe désorganisée. L'ensemble de ces édifices cellulosiques baigne dans une matrice contenant, entre autre, les lignines qui gênent les activités cellulasiques et hémicellulasiques microbiennes (COWLING et KIRK, 1976; MES-HARTREE et SADDLER, 1983; SADDLER et al., 1982)

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose dépend par ailleurs de son degré de cristallinité, de son degré de polymérisation, et de la nature des systèmes enzymatiques eux-même (leur taille déterminant leur capacité de diffusion par rapport à la porosité des celluloses)

De nombreuses études concernent les traitements physiques et/ou chimiques permettant d'améliorer l'accessibilité des celluloses par une rupture des liaisons cellulose/lignine et une déstabilisation des structures cristallines de la cellulose. Il s'agit essentiellement de traitements à la soude (Mc DONALD et al., 1983; AVGERINOS et WANG, 1983) et à l'acide (BOYER et REDMOND, 1983; CHEN et GONG, 1982); de



MICROORGANISMES MESOPHILES	CELLULOSE	XYLANE	AMIDON	PECTINE	DEXTRINES	CELOBIOSE	GLUCOSE	XYLOSE	ARABINOSE	BIOTOPE
Bacteroides succinogenes	+	-	±	+	±	+	+	-	-	rumen
Ruminococcus flavefaciens	+	-	-		-	+	±	-		"
Ruminococcus albus	+	+	-		-	±	±	-	±	"
Butyrivibrio fibrisolvens	±	±	±	+	+	±	+	±	+	"
Eubacterium cellulosolvens	+	-	-	-	±	+	+	-	-	"
Clostridium lochheadii	+	-	+	-		+	+	-	-	"
Clostridium longisporum	+	-	-	-	-	+	+	-	-	"
Clostridium cellobioparum	+		+			+	+	+	+	rumen
Clostridium papyrosolvens	+					+	+	+	+	sédiments
Acetivibrio cellulolyticus	+		-			+	-	-	-	digesteurs
Succinimonas amylolytica	-	-	+		+	-	+	-	-	rumen
Lachnospira multiparus	-	-	±	+	-	+	+	±	-	"
Butyrivibrio alactacidigens	-	+	+	+	±	+	+	-	±	"
Bacteroides ruminicola	-	±	±	+	±	+	+	±	±	"
Selenomonas ruminantium	-	-	±	-	±	+	+	+	+	"
Succinivibrio dextrinosolvens	-	-	-	+	+	-	+	+	±	"
Eubacterium ruminantium	-	±	-	-	±	+	+	±	±	rumen
Streptococcus bovis	-		+			+	+	-	±	rumen
MICROORGANISMES THERMOPHILES										
Clostridium thermocellum	+	±	-	-	-	+	-	-	-	digesteurs
Clostridium thermocellulaseum	+		+		+	+	+	+	+	
Clostridium stercorarium	+		+			+	+	+	+	composte
Clostridium thermosulfurogenes	-		+	+		+	+	+	+	sources chaudes

TABLEAU n° 1 - COMPARAISON DES PRINCIPALES BACTERIES HYDROLYTIQUES  
MESOPHILES ET THERMOPHILES, ANAEROBIES STRICTES.

substrats fermentés (+), non fermentés (-), fermentés par quelques souches (±),  
fermentés par la majorité des souches (±)

traitements à la vapeur, suivis d'une dépressurisation brutale (DALE et MOREIRA, 1982; PFEFFER et KHANN, 1976); des broyages (RYU et al., 1982; NEILSON et al., 1982) et des irradiations (HAN et CIEGLER, 1982; LILLEHOJ et HAN, 1983).

#### A.2.- Les principales espèces anaérobies cellulolytiques:

Ces espèces sont regroupées au tableau 1. Elles ont été isolées de sédiments : Clostridium papyrosolvans (MADDEN et al., 1982) de digesteurs : Acetivibrio cellulolyticus (PATEL et al., 1980) et surtout du rumen (HUNGATE, 1950; 1966; BRYANT, 1959; DEHORITY, 1963). Les espèces les plus actives dans le rumen sont Bacteroides succinogenes, Ruminococcus albus et R. flavofaciens. Récemment, une nouvelle espèce du genre Clostridium a été isolée (GIALLO et al., 1983) mais sa description reste incomplète.

Parmi les différentes espèces bactériennes thermophiles connues, deux seulement sont cellulolytiques: Clostridium thermocellum (Mc BEE, 1950; NG et al., 1977) et Clostridium stercoararium (MADDEN, 1983). Clostridium thermocellulaseum, qui avait été isolé par ENEBO (1951) a été ré-étudié par LEE et BLACKBURN (1975) pour ses capacités cellulolytiques. Cette espèce bactérienne présente à la fois les caractéristiques de C. thermocellum et C. stercoararium.

#### A.3.- L'hydrolyse enzymatique de la cellulose:

L'hydrolyse naturelle de la cellulose est réalisée en plusieurs étapes et différentes enzymes réalisent l'attaque préférentielle des zones amorphes et cristallines.

A la suite des nombreux travaux effectués sur les complexes cellulases excrétés par les champignons (T. reesei et T. viride), REESE et MANDELS (1964) ont émis l'hypothèse d'un complexe enzymatique constitué de trois fractions :

- Un complexe C1: 1,4  $\beta$  D-glucan cellobiohydrolase (E.C. 3.2.1.91) encore appelé exo-cellulase, qui agit libre du cellobiose à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes de cellulose. Cette fraction enzymatique agirait préférentiellement sur les zones cristallines, mais uniquement en présence du complexe CX (LI et al., 1965 ; SPREY et LAMBERT, 1983).

	HYDROLYSE DE LA CELLULOSE (%)	
	C. STERCORARIUM	T. REESEI
SURNAGEANT DE CULTURE	117	
CELLOBIASE		0
ENDO-GLUCANASE	47	0
EXO-GLUCANASE	23,4	43,9
ENDO + EXO-GLUCANASE	87	92,7
EXO-GLUCANASE+CELLOBIASE		73,7
ENDO + EXO-GLUCANASE + CELLOBIASE	100	100

TABEAU n° 2 - HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR LES DIFFERENTES FRACTIONS ENZYMATIQUES DE C. STERCORARIUM ET T. REESEI.

(d'après CREUZET et al, 1983; GONG et al, 1979)

ENZYMES	SUBSTRATS	ACTIVITES (U.I./mg)	
		C. thermocellum	T. reesei
exo-glucanase	avicel	0,09	0,37
endo-glucanase	C.M.C.	4,63	7,86
xylanase	xylane	0,53	1,00

TABEAU n° 3 - COMPARAISON DES ACTIVITES HYDROLYTIQUES SPECIFIQUES DE C. THERMOCELLUM (souche LQRI) ET T. REESEI (souche QM 9414)

(d'après NG et ZEIKUS, 1981 b)

- Un complexe CX: 1,4  $\beta$  D-glucan hydrolase (E.C.3.2.1.3) encore appelé endo-cellulase, qui agit au hasard sur les fibres de cellulose en libérant du glucose, du cellobiose et des cellodextrines. Cette fraction enzymatique attaquerait préférentiellement les zones amorphes.

- Une cellobiase ou  $\beta$  glucosidase (E.C.3.2.1.21) qui hydrolyse en glucose le cellobiose et les cellodextrines de degré de polymérisation inférieur à 6.

Ces trois fractions agiraient en synergie dans l'hydrolyse de la cellulose (tableau 2).

Très peu d'études concernent l'activité exo-cellulasique des bactéries anaérobies. Chez les espèces ayant une forte capacité hydrolytique, cette activité est en effet très faible par rapport à celle des champignons. C. thermocellum possède une cellobiohydrolase 4 à 7 fois moins active que celle de T. reesei (tableau 3). Celle-ci serait inhibée par l'oxygène (JOHNSON et al., 1982) mais pas par le glucose ni par le cellobiose contrairement à ce que l'on observe dans le cas des exo-cellulases fongiques (OKADA et al., 1968; SELBY et MAITLAND, 1967; GONG et al., 1979).

Les systèmes enzymatiques présentent une multiplicité au niveau de chaque fraction (RABINOVITCH et al., 1983). Deux fractions exo-cellulasiques ont été purifiées chez Trichoderma koningii (WOOD et Mc CRAE, 1972). Quatre fractions endo-cellulasiques ont été purifiées chez T. reesei (GONG et al., 1979; LABUDOVA et FARKAS, 1983) et deux chez T. koningii (HALLIWELL et VINCENT, 1981). De même, deux  $\beta$  glucosidases ont été purifiées chez T. reesei (INGLIN et al., 1980). Chez C. thermocellum, deux fractions endo-cellulasiques ont été mises en évidence par clonage chez E. coli des gènes codant pour la synthèse des cellulases de cette espèce bactérienne (CORNET et al., 1983). Une des fractions ainsi mise en évidence était, en effet, totalement différente de celle qui avait été préalablement purifiée et caractérisée par NG et ZEIKUS (1981 b) et PETRE et al. (1981).

Les endo-cellulases sont endocellulaires chez la plupart des bactéries isolées du rumen, comme chez R. flavefaciens, chez qui elles sont liées à la paroi (PETTIPHER et LATHAN, 1979; LATHAN et al., 1978). Par contre la majorité des espèces ayant une forte activité hydrolytique, possèdent des endo-cellulases extracellulaires. C'est le cas de C. thermocellum (GARCIA-MARTINEZ et al., 1980), de C. stercorarium (CREUZET et FRIXON, 1983) d'A. cellulolyticus (KHAN, 1980)

Ach. 4. 6. 110

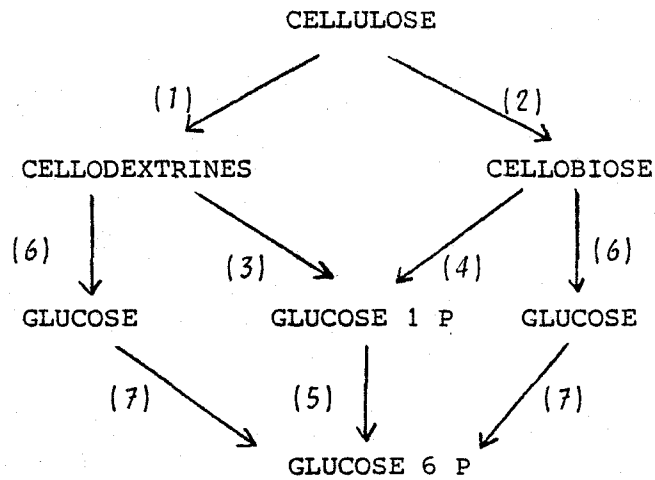


FIGURE n ° 3 - SCHEMA D'HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR C. THERMOCELLUM

(1) endo B 1,4 glucanase; (2) exo B 1,4 glucanase; (3) cellosextrine phosphorylase; (4) cellobiose phosphorylase; (5) phosphoglucomutase (6) B glucosidase; (7) glucokinase.

BACTERIE	ENZYME	P.M.	pH opt.	t (°C) opt.	réf.
Champignons	C.M.C.ase	5 300- 145 000	4,8	30-50	LEE et FAN, 1980
	exo-glucanase	42000-65 000	4,8	50	
	B-glucosidase	50000-410000	4,8	50	
C. thermocellum	C.M.C.ase	53-55 000			BEGIN et al, 1983
		210 000			LAMED et al, 1983
	B-glucosidase	83-94 000	5,2	62	NG et al, 1981
C. stercorarium	C.M.C.ase	43 000	6,0	65	AIT et al, 1982
R. albus	C.M.C.ase	91-99 000	6,4		CREUZET et FRIXON, 1983
B. succinogenes	complexe total		6,0-6,8	45	SMITH et al, 1973
mixte rumen	C.M.C.ase		5,6-6,0	50	
	complexe total		6,9	49	FRANCIS et al, 1978

TABLEAU n ° 4 - CARACTERISTIQUES DE QUELQUES FRACTIONS ENZYMATIQUES DE BACTERIES ANAEROBIES PAP

de R. albus (HALLIWELL, 1979) et de B. succinogenes (FORSBERG et GROLEAU, 1981; GROLEAU et FORSBERG, 1983). Cette dernière présente d'autre part la particularité d'excréter dans le milieu des "vésicules enzymatiques" ayant à la fois des activités hémicellulasiques et cellulases (FORSBERG et al., 1981; GROLEAU et FORSBERG, 1981). Des études récentes ont également mis en évidence chez C. thermocellum l'excrétion d'un complexe enzymatique de haut poids moléculaire (LAMED et al., 1983), ayant aussi la propriété d'adhérer aux fibres de cellulose (BAYER et al., 1983).

Les  $\beta$  glucosidases des bactéries anaérobies sont généralement situées dans l'espace périplasmique des cellules (WOODWARD et WISEMAN, 1982). C'est le cas de C. stercorarium (CREUZET et al., 1983), d'A. cellulolyticus (KHAN, 1980), de B. succinogenes (FORSBERG et GROLEAU, 1982) et de C. thermocellum (AIT et al., 1982). Chez cette dernière la  $\beta$  glucosidase a d'autre part une affinité plus grande pour le laminaribiose (liaisons  $\beta$  1,3) que pour le cellobiose (liaisons  $\beta$  1,4). C. thermocellum possède d'autre part deux autres enzymes: une cellobiose phosphorylase (ALEXANDER, 1972 a) et une cellodextrine phosphorylase (SHETH et ALEXANDER, 1967; ALEXANDER, 1972 b) permettant une assimilation directe du cellobiose et des cellodextrines. L'hydrolyse de la cellulose par C. thermocellum se ferait alors selon le schéma résumé figure 3.

#### A.4.- Caractéristiques des cellulases bactériennes et comparaison avec les cellulases fongiques.

##### A.4.1.- Caractéristiques:

La taille des cellulases détermine leur capacité de diffusion par rapport à la porosité des celluloses. Une étude bibliographique de LEE et FAN (1980) montre que la taille des cellulases fongiques est inférieure à celle des bactéries aérobies, ce qui expliquerait en partie leur meilleure activité. Jusqu'à présent, très peu de travaux ont porté sur la purification de cellulases des bactéries anaérobies strictes. Le tableau 4 regroupe les principaux résultats disponibles. Les deux espèces les plus actives, C. thermocellum et B. succinogenes, excrètent dans le milieu des agglomérats enzymatiques de très haut poids moléculaires (supérieur à

CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM	TRICHODERMA REESEI
<p>rapport endo-glucanase/exo-glucanase élevé</p> <p>activité cellobiasique intracellulaire</p> <p>activité et stabilité à 60-70°C (25-50% de stabilité)</p> <p>en conditions optimales:  V<sub>max</sub> = 0,4 μmol/mn/mg  énergie d'activation: 33 KJ  coef. température: 1,8  K<sub>max</sub> : 18,2</p> <p>inhibition par Ag<sup>++</sup> et Hg<sup>++</sup></p> <p>pas d'inhibition jusqu'à 10 mM</p> <p>inhibition par Cu<sup>++</sup> ( 20 mM) et Zn<sup>++</sup> ( 150 mM)</p> <p>pas d'inhibition par le glucose, le cellobiose et le xylose</p>	<p>activité exo-glucanasique supérieure</p> <p>activité intra et extracellulaire</p> <p>activité et stabilité de 25 à 50°C (60% de dénaturation à 60°C-30 mn)</p> <p>0,62  43 KJ  1,6  7,2</p> <p>pas d'inhibition à concentration 20 μM</p> <p>inhibition par Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup></p> <p>inhibition identique</p> <p>inhibition par le glucose (73 mM) et le cellobiose (29 mM)</p>

TABLEAU n°5 - COMPARAISON DES CELLULASES DE C.THERMOCELLUM ET T.REESEI

( d'après NG et ZEIKUS, 1981 b)

200 000). Bien que cette taille soit trop importante pour une diffusion facilitée, l'adhésion de ces concentrats enzymatiques peut expliquer la forte activité hydrolytique de ces espèces.

Le pH optimum d'activité des cellulases bactériennes est situé à pH acide (5,0-6,5) et toujours inférieur au pH optimum de croissance de ces bactéries (7,0-7,4). D'autre part, si les bactéries thermophiles ont un système enzymatique actif à la température de croissance (60°C), les bactéries mésophiles, par contre, ont une température optimale d'activité hydrolytique (50°C) supérieure à leur température de croissance (35°C).

#### A.4.2.- Induction et répression des cellulases:

Chez les champignons, le lactose (TRIVEDI et RAD, 1980), la salicine et le sophorose (STERNBER et MANDELS, 1979, 1980 ; MONTENECOURT et al., 1979; NISIZAWA et al., 1971) peuvent induire la synthèse des cellulases. Mais la cellulose, elle-même, reste le meilleur inducteur de cellulases (TRIVEDI et RAD, 1980 ; REESE et al., 1969; TANGNU et al., 1981). Le rôle du cellobiose est complexe dans la mesure où il induit la formation de cellulases chez de nombreux champignons, mais inhibe aussi leurs activités (GONG et al., 1979). Certains analogues structuraux comme le thiocellobiose (RHO et al., 1982) et le cellobiose di-palmitate (REESE et al., 1969), induisent la synthèse de glycosidases en évitant les problèmes de répression catabolique. Une étude récente d'ARRIETA-ESCOBAR et BELIN (1982) a d'autre part montré que certains composés polyphénoliques dérivés de la lignine pouvaient être inducteurs des cellulases fongiques.

Chez C. thermocellum, les cellulases sont constitutives (CREUZET et al., 1980) et ne sont pas soumises à la répression catabolique comme le sont celles des bactéries du rumen (FUSEE et LEATHERWOOD, 1972; SMITH et al., 1973 ; STEWARD, 1977 ; HALLIWELL, 1957 ; FRANCIS et al., 1978). Chez R. albus et R. flavefaciens, ces auteurs ont montré que les cellulases ne sont pas inhibées par les sucres (glucose et cellobiose) mais que la synthèse enzymatique est réprimée à 95% par 10 g/l de cellobiose et à 65% par 5 g/l de glucose. Des travaux récents (HILTNER et DEHORITY, 1983) ont toutefois montré que le pourcentage de dégradation de la cellulose par R. flavefaciens est inversement proportionnel à la quantité de sucres ajouté. Par contre, le temps de



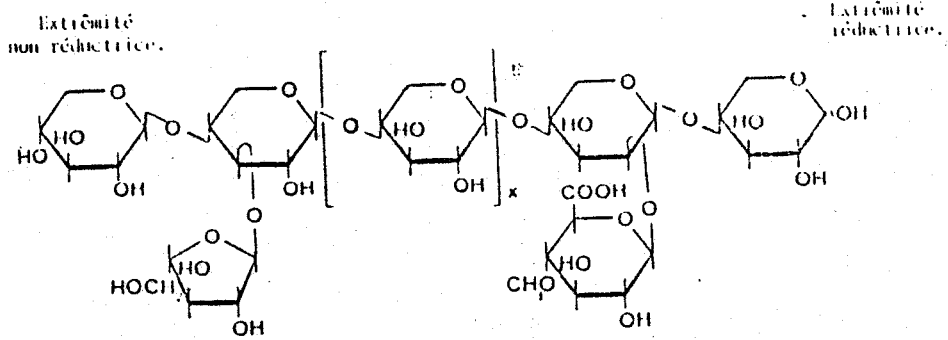


FIGURE n° 4 - REPRESENTATION DE LA STRUCTURE DU XYLANE -

latence de la cellulolyse par R. albus, R. flavefaciens et B. succinogenes est diminué par l'apport de sucres, la croissance de ces bactéries étant favorisée.

Les cellulases de C. thermocellum ne sont pas inhibées par les sucres (glucose, cellobiose et xylose) même en fortes concentrations (NG et ZEIKUS, 1981 a; SHINMYO et al., 1979). Par contre, comme chez R. albus (FUSEE et LEATHERWOOD, 1972) ces enzymes sont partiellement inhibées par l'oxygène (JOHNSON et al., 1982). En présence d'un agent réducteur (dithiothreitol), ces auteurs ont en effet montré que les cellulases de C. thermocellum étaient aussi actives que celle de T. reesei.

L'activité cellulolytique de C. thermocellum est améliorée en présence de  $\beta$  glucosidase (AIT et al., 1979). Toutefois, ceci reflète plus une action synergique des enzymes (la  $\beta$  glucosidase de C. thermocellum n'étant pas libérée dans le surnageant) qu'une inhibition par le cellobiose.

Chez C. stercorarium, par contre, l'endo-cellulase n'est pas inhibée par le glucose mais par le cellobiose (1,25 mM inhibant 50% de l'enzyme, CREUZET et FRIXON, 1983).

## B. - HYDROLYSE DES XYLANES

### B.1.- Les xylanes

A l'encontre de la cellulose, les xylanes sont des hétéropolymères amorphes constitués par un squelette principal de résidus anhydroxylose liés en  $\beta$  1,4 et portant des chaînes latérales de nature très variable en fonction de l'origine de ce polysaccharide. En fait, deux types de résidus sont essentiellement présents : l'arabinofuranose et l'acide glucuronique méthylé. La figure 4 schématise la structure générale des xylanes.

### B.2.- Hydrolyse enzymatique des xylanes

Les microorganismes hémicellulolytiques mettent en jeu de nombreux enzymes leur permettant une hydrolyse totale des hémicelluloses (tableau 6).

GLUCANE HYDROLASES	TYPES	MODE D'ACTION	PRODUITS DE LA REACTION
L ARABINASES	endo L arabinase	rare - peu d'étude	
	exo L arabinase	résidus (1-3) et (1-5) $\alpha$ L arabino furanosyl des L arabanes, L arabino D xylanes, gomme arabique, phényl $\alpha$ L arabino furanosides.	L arabinose
D MANNANASES	endo D mannanase	(1-4) $\beta$ D mannopyranosyl des D mannans, D galacto D mannans, D gluco D mannans	D glucose, D mannose, manno et glucomanno oligosaccharides
D GALACTANASES	endo (1-3) $\beta$ D galactan-galactohydrolase	liaisons (1-3) $\beta$ D galactopyranosyl des arabinogalctanes	D galactose, D galactobiose et galactotriose.
	endo (1-4) $\beta$ D galactan-galactohydrolase	liaisons (1-4) $\beta$ D	arabino galacto oligosaccharides
	exo (1-4) $\beta$ D galactanases		D galactose
D XYLANASES	endo (1-3) $\beta$ D xylanase	liaisons (1-3) $\beta$ D	D xylose, xylooligosaccharides
	exo (1-3) $\beta$ D xylanase	"	D xylose
	endo (1-4) $\beta$ D xylanase	liaisons (1-4) $\beta$ D des xylanes, arabino xylanes, arabinoglucuronoxylanes, etc.	xylose, xylobiose, xylotriase, arabinose, arabinoxyloligosaccharides
	exo (1-4) $\beta$ D xylanase	"	xylose

TABLEAU n° 6 - LES DIFFERENTES HEMICELLULASES ET LEURS ACTIONS -

(d'après DEKKER et RICHARDS, 1976)

Les principales bactéries anaérobies hémicellulolytiques sont regroupées au tableau 1 ; la plupart de ces espèces sont également cellulolytiques.

L'hydrolyse complète des xylanes va nécessiter l'action préalable d'arabinofuranosidase et de glucuronidase, la présence de résidus arabinoses et d'acides glucuroniques venant empêcher l'action des endo-xylanases (DEKKER et RICHARD, 1976).

Les xylanases fongiques ont surtout été étudiées chez T. reesei (DEKKER, 1983) T. viride (HASHIMOTO et al., 1971). Chez Sporotrichum dimorphosporum, CONTAT (1983) a mis en évidence jusqu'à 9 xylanases ayant des activités spécifiques variables sur CMC, cellobiose, amylopectine, etc... De même, l'endo-xylanase extracellulaire de T. reesei est constituée de 5 fractions enzymatiques (DEKKER, 1983); chez Aspergillus niger 2 fractions xylanasiques et une xylobiase ont été purifiées (KAKENISHI et TSUJISAKA, 1975). Il est intéressant de constater que, dans ce dernier cas, la xylobiase agit en synergie avec l'une ou l'autre des endo-xylanases, mais que les deux fractions endo-xylanasiques ne se complètent pas.

Chez les bactéries du rumen, les xylanases et les arabinases sont liées à la paroi (WILLIAMS et WITHERS, 1981) et de type endo-glucanase. Les xylanases de ces bactéries ont une plus grande affinité pour le D xylane que pour les hémicelluloses ramifiées comme l'arabino-xylane, les résidus arabinose pouvant agir comme inhibiteur (HOWARD et al., 1960). Dans ce dernier cas, la dégradation des arabino-xylanes nécessite l'action préalable des L-arabinofuranosidases, suivie de celle des xylosidases et des xylanases (GAILLARD et al., 1965 ; WILLIAMS et WITHERS, 1982 b). De plus, à l'exception de certaines souches de R. flavefaciens, B. succinogenes et B. ruminicola, toutes les bactéries hémicellulolytiques du rumen produisent simultanément des arabinases et des L-arabinofuranosidases.

Suivant les espèces bactériennes ces enzymes peuvent être inductibles ou constitutives. Chez B. succinogenes, le xylane est le meilleur inducteur de xylanases, mais chez la plupart des autres souches testées par WILLIAMS et WITHERS (1982 b), le xylose est le meilleur inducteur de la synthèse des xylanases. Les xylanases sont constitutives chez R. flavefaciens (PETTIPHER et LATHAN, 1979), elles sont inductibles chez B. amylogenes et Butyrivibrio sp. (HOWARD et al.,

1960). De même, chez la plupart des bactéries du rumen, la synthèse des arabinases est favorisée par la présence d'arabinane et d'arabinose (WILLIAMS et WITHERS, 1982 b).

Les xylanases des champignons présentent une activité optimale à pH acide, de pH 4,0 à 5,0 et à température élevée, de 50 à 70°C (DEKKER, 1983 ; ZALESWSKA et URBANEK, 1981 ; TSUNODA et al., 1977). Par contre, les bactéries du rumen ont une activité optimale à pH plus élevé: de pH 5,5 (HOWARD et al., 1960) à pH 6,0 (WALKER et HOPGOOD, 1961) et à une température plus faible de 37 à 40°C.

Les xylanases de B. amylogenes et Butyrivibrio sp., contrairement à celle de T. reesei, ne sont pas actives sur CMC (HOWARD et al., 1960). DEHORITY (1973) a d'autre part montré qu'il existe peu de synergie entre bactéries cellulolytiques et bactéries hémicellulolytiques pour la dégradation de la cellulose.

Toutefois en raison de la diversité des substrats dans le rumen, cette synergie entre les différentes espèces hydrolytiques, comprenant aussi des Protozoaires (BAILLEY et GAILLARD, 1965) permet un rendement maximal de dégradation des celluloses, hémicelluloses et pectines.

Si les bactéries hémicellulolytiques mésophiles sont relativement bien connues, il n'en va pas de même en thermophilie. Aucune souche thermophile anaérobie stricte n'est actuellement étudiée pour ses capacités hémicellulolytiques. C. thermocellum est capable d'hydrolyser les xylandes, mais sans pouvoir fermenter les pentoses produits (GARCIA-MARTINEZ et al., 1980). C. stercorarium, par contre, fermente le xylose et possède une xylanase (MADDEN, 1983) mais aucune étude n'a encore été faite sur ces capacités hémicellulolytiques.

Bien que les microorganismes aérobies aient été jusqu'alors les plus étudiés, les bactéries anaérobies présentent un potentiel intéressant double: d'une part par leurs capacités cellulases, lors d'une étude récente KHAN et VAN DEN BERG (1981) ont obtenu une activité cellulase comparable à celle de T. reesei avec une population anaérobie mixte et d'autre part par leurs capacités fermentaires. outre son rôle important dans les systèmes d'épuration (COUPLLET et ALBAGNAC, 1978), la fermentation anaérobie constitue la base de la production microbienne d'énergie. En absence d'O<sub>2</sub>, la matière organique est catabolisée en un grand nombre de produits intéressants pour l'industrie (éthanol, méthane, acétate, acétone-butanol etc.), au lieu d'être complètement minéralisée en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Or actuellement peu de bactéries anaérobies sont utilisées dans les procédés industriels.

BACTERIES MESOPHILES	FORMATE	ACETATE	PROPIONATE	BUTYRATE	LACTATE	SUCCINATE	ETHANOL	H2	CO2
Bacteroides succinogenes	+	+	-	-	-	++	-	-	±
Ruminococcus flavefaciens	±	+	-	-	±	++	#	#	±
Ruminococcus albus	+	+	-	-	#	#	+	+	+
Eubacterium cellulosolvens	#	±	-	-	+++	#	-	+	
Butyrivibrio fibrisolvens	++	+u	-	+	+	-	+	+	+
Clostridium lochheadii	+	+	-	+	±	-	+	+	+
Clostridium longisporum	+	+	-	-	#	-	-	±	+
Clostridium cellobioparum	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Clostridium papyrosolvens	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Acetivibrio cellulolyticus	-	++	-	-	-	-	+	+	+
Bacteroides amylophilus	+	+	-	-	±	++	-	-	±
Succinimonas amylolytica	-	+	+	-	-	++	-	-	±
Megasphaera elsdenii	-	+u	+	+	-	-	-	+	+
Lachnospira multiparus	+++	+	-	-	+	+	+	+	+
Butyrivibrio alactacidigens	+	+	-	++	-	-	-	+	-
Bacteroides ruminicola	+	+	-	-	-	++	-	-	±
Succinivibrio dextrinosolvens	+	++	-	-	±	++	-	-	±
Streptococcus bovis	±	±	-	-	+++	-	±	-	#
Eubacterium ruminantium	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Clostridium saccharolyticum	-	++	-	-	+	-	++	+	+
Selenomonas ruminantium	-	+	+	-	+	-	-	-	+
BACTERIES THERMOPHILES									
Clostridium thermocellum	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Clostridium thermohydrosulfu- ricum	-	+	-	-	+	-	++	+	+
Clostridium thermosaccharoly- ticum	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Clostridium stercorarium	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Clostridium thermosulfurogenes-		+	-	-	+	-	+	+	+
Clostridium thermoautotrophicum		+++	-	-	-	-	-	-	-
Clostridium thermoaceticum	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Acetogenium kivui	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Thermoanaerobacter acetoethylicus	-	++	-	-	-	-	++	+	+
Thermoanaerobacter ethanolicus		+	-	-	+	-	+++	+	+
Thermoanaerobium brockii	-	+	-	-	+	-	++	+	+

TABEAU n° 7 - PRODUITS DE FERMENTATION DE QUELQUES BACTERIES HYDROLYTIQUES  
ET FERMENTATIVES MESOPHILES ET THERMOPHILES -

## II- FERMENTATION DES OSES CHEZ LES BACTERIES ANAEROBIES

Dans les écosystèmes anaérobies, les polymères glucidiques sont fermentés par des populations mixtes incluant les bactéries hydrolytiques et les bactéries fermentatives. Le tableau 7 résume les principaux métabolites formés par l'ensemble des espèces bactériennes. A quelques exceptions près, les produits de fermentation sont des mélanges d'acides gras volatils, d'éthanol, de lactate, et d' $H_2/CO_2$ , en proportions variables selon les microorganismes.

A l'exception des bactéries hétérolactiques qui utilisent la voie de la Phosphocétolase, les bactéries anaérobies fermentent les hexoses par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS, et les pentoses par la voie de WARBURG-DICKENS (tableau 8). Il existe d'autres voies moins répandues : le cycle d'ENTNER-DOUDOROFF, caractéristique de *Zymomonas mobilis*, et la voie des Bifidobacteria.

### A.- LES DIFFERENTES VOIES D'ATTAQUE DES OSES ET LES ENZYMES CARACTERISTIQUES (DOELE, 1975 ; GOTTSCHALK, 1979 ; WOOD, 1961)

#### A.1.- La voie d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS : (planche I, annexe)

Cette voie est caractérisée par la fructose di phosphate aldolase (formant du glycéraldéhyde 3-P et du di hydroxyacétone-P à partir du fructose 1,6 di-P) et la triose phosphate isomérase (transformant le di hydroxyacétone-P en glycéraldéhyde 3-P).

Le bilan global de cette réaction est de 2 moles de pyruvate et 2 moles d'ATP par mole d'hexose fermenté.

#### A.2.- La voie des hexoses monophosphate (voie de WARBURG-DICKENS) : (planche II, annexe)

Cette voie est caractérisée par la glucose 6-phosphate déshydrogénase, la phosphogluconate déshydrogénase (convertissant les hexoses en pentoses), la transaldolase et la transcétolase.

Le bilan global de cette voie de dégradation est de 5 moles de pyruvate, 3 moles de  $CO_2$  et 5 moles d'ATP pour 3 moles d'hexoses fermentés.

voie d'EMDEN-MEYERHOF-PARTNAS	1 hexose $\longrightarrow$ 2 pyruvate + 2 NADH + 2 ATP
voie de la PHOSPHOCETOLASE	1 hexose $\longrightarrow$ 1 pyruvate + 1 CO <sub>2</sub> + 1 acétyl P + 3 NADH + 1 ATP
	1 pentose $\longrightarrow$ 1 pyruvate + 1 acétyl P + 1 NADH + 1 ATP
voie de WARBURG-DICKENS	3 hexoses $\longrightarrow$ 5 pyruvate + 3 CO <sub>2</sub> + 5 NADH + 5 ATP
	3 pentoses $\longrightarrow$ 5 pyruvate + 5 NADH + 5 ATP

TABLEAU n° 8 - VOIES DE DEGRADATION DES SUCRES UTILISEES PAR LES BACTERIES ANAEROBIES



A.3.- La voie de la phosphocétolase : (planche III, annexe)

Cette voie est caractérisée jusqu'aux pentoses-P par les mêmes enzymes que la voie de WARBURG-DICKENS (glucose 6-P déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase). Les pentoses-P sont ensuite transformés en glycéraldéhyde 3-P et acétyl-P par la phosphocétolase.

Le bilan de cete réaction est de 1 mole de pyruvate, 1 mole de CO<sub>2</sub> et 1 mole d'ATP par mole d'hexose fermenté.

A.4.- La voie d'ENTNER-DOUDOROFF est caractérisée par la 2-céto,3-déoxy,6-phosphogluconate aldolase formant du glycéraldéhyde 3-P et du pyruvate à partir du 2-céto,3-déoxy,6-phosphogluconate. Le bilan de cette réaction est de 2 moles de pyruvate et 1 mole d'ATP par mole d'hexose fermenté. La voie des Bifidobacteries est caractérisée par la fructose-6 phosphocétolase (transformant le fructose 6-P en erythrose 4-P et acétyl-P), la transaldolase et la transcétolase (transformant les hexoses en pentoses-P) et la xylulose 5-P phosphocétolase (transformant les pentoses 5-P en glycéraldéhyde 3-P et acétyl-P). Le bilan de cette voie de dégradation est de 1 mole de pyruvate, 1 mole d'acétyl-P et 1 mole d'ATP par mole d'hexose.

B.- LA DECARBOXYLATION DU PYRUVATE

Chez les anaérobies, la transformation du pyruvate en acetyl coA est réalisée par trois types de réactions qui confèrent aux microorganismes des propriétés métaboliques tout à fait particulières.

B.1.- La réaction phosphoroclastique :

Cette réaction est la plus largement répandue. Elle est en particulier caractéristique des Clostridia. La décarboxylation et la déshydrogénation du pyruvate sont catalysées par la pyruvate ferredoxine oxydoréductase (UYEDA et RABINOWITZ, 1971 ; RAEBURN et RABINOWITZ, 1971 a et b):

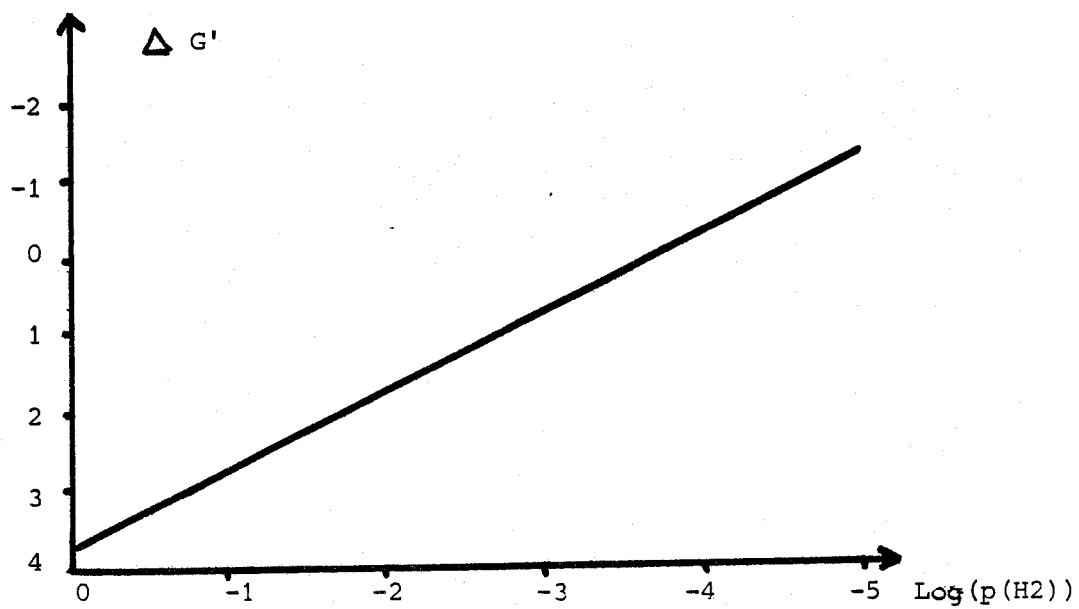
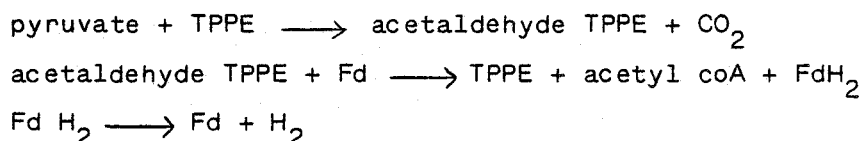
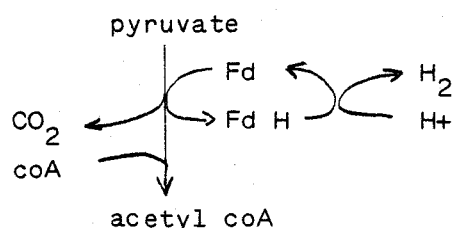


FIGURE n° 5 - VARIATION D'ENERGIE LIBRE DE LA REACTION

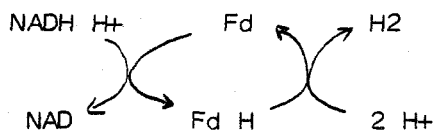
$\text{NADH}_2 \longrightarrow \text{NAD} + \text{H}_2$ , EN FONCTION DE LA PRESSION PARTIELLE D' $\text{H}_2$



L'accepteur d'électron est la ferredoxine dont le potentiel redox très bas ( $E'^{\circ} = -0,41 \text{ mV}$ ) permet le transfert d'électrons de la ferredoxine réduite sur les protons et la libération d' $\text{H}_2$ , même si la pression partielle d'hydrogène est élevée. Le Coenzyme A, le pyrophosphate de thiamine sont des cofacteurs de cette réaction (HESPELL et al, 1969). De même, les ions métalliques divalents sont nécessaires; de plus, la ferredoxine étant une protéine contenant 8 atomes de fer, une carence en fer peut dévier le métabolisme vers la production de lactate.

L'oxydation d'une molécule de pyruvate est donc couplée à la production d'une molécule d' $\text{H}_2$ . Certains Clostridia produisent toutefois plus d'hydrogène qu'ils ne dégradent de pyruvate (THAUER et al., 1977) et cette production supplémentaire d' $\text{H}_2$  provient des NADH générés au cours de la glycolyse.

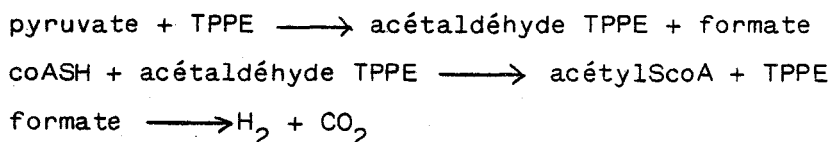
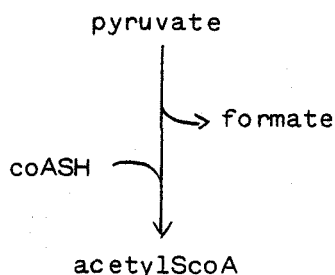
La NADH ferredoxine oxydoréductase permet la réduction de la ferredoxine par le NADH (PETIT-DEMANGE et al., 1974), et le transfert des équivalents réducteurs sur les protons via l'hydrogénase:



L'activité de cette enzyme est régulée par le rapport acétyl CoA/CoA, l'acétyl CoA agissant comme activateur allostérique et le CoA comme inhibiteur. Cette réaction est réversible et alors inhibée par le NADH. Elle est thermodynamiquement très défavorable mais devient possible à faible pression partielle d'hydrogène (figure 5).

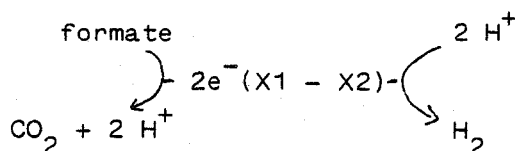
B.2.- La réaction thioclastique :

Chez les Entérobactéries, les microcoques, ainsi que chez certains Streptocoques et certains Clostridia (GOTTSCALK, 1979), la décarboxylation du pyruvate est catalysée par la pyruvate formate lyase (CHASE et RABINOWITZ, 1968)..



Le pyrophosphate de thiamine, le Coenzyme A, et les ions métalliques divalents sont aussi des cofacteurs de cette réaction.

La formate hydrogène lyase est responsable de la formation d'hydrogène et de gaz carbonique à partir du formate. Les réactions en jeu ne sont pas encore parfaitement élucidées. Le formate est oxydé en CO<sub>2</sub> par la formate déshydrogénase et les électrons produits servent à la réduction des protons par l'hydrogénase; mais la nature des transporteurs d'électrons X1 et X2 n'est pas déterminée:



B.3.- La pyruvate décarboxylase :

Chez les levures et chez Zymomonas mobilis, la décarboxylation du pyruvate se fait directement par la pyruvate décarboxylase ce qui se traduit par la formation de CO<sub>2</sub> et d'acétaldéhyde, précurseurs directs de l'éthanol, produit en grandes quantités par ces microorganismes.

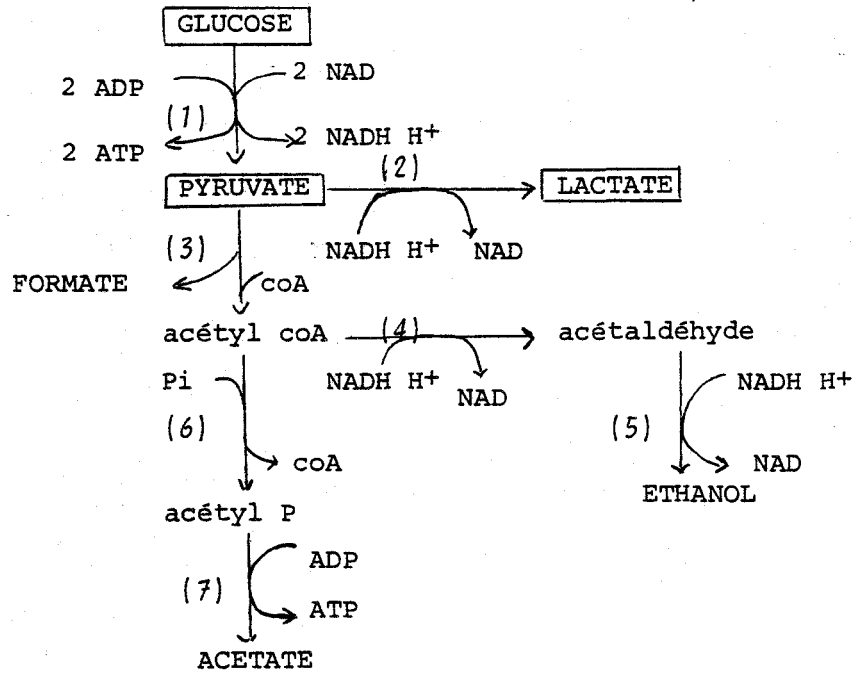
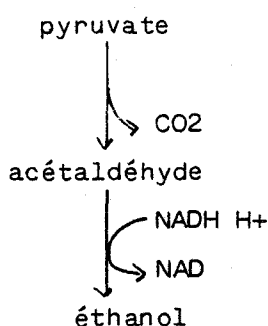


FIGURE n° 6- FERMENTATION HOMOLACTIQUE

(1) voie EMP; (2) lactate déshydrogénase; (3) pyruvate-formate-lyase; (4) acétaldéhyde déshydrogénase; (5) alcool déshydrogénase; (6) phospho-transacétylase; (7) acétate kinase.



## C.- LES VOIES DE PRODUCTION DE METABOLITES ET LEUR REGULATION

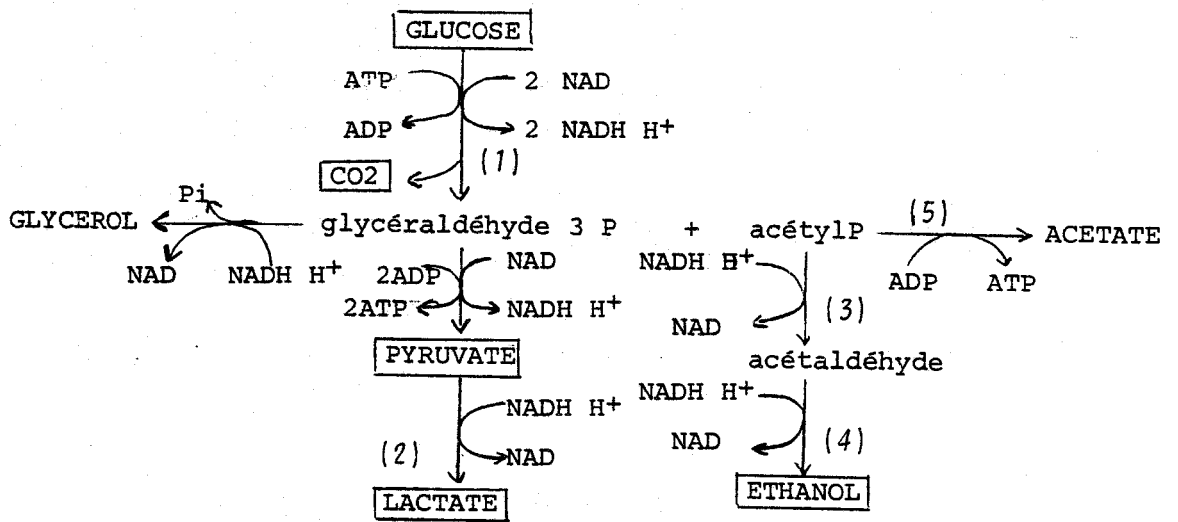
### C.1.- La production de lactate :

#### C.1.1.- Les voies de production de lactate :

Ce type de fermentation est réalisé par un grand nombre de microorganismes appartenant aux genres Leuconostoc, Pediococcus, Microbacterium, Bifidobacterium, et surtout, Lactobacillus, Streptococcus et Sporolactobacillus (DOELE, 1975 ; WOOD, 1961 ; STAMER, 1979)

Les bactéries homolactiques dégradent les hexoses par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF. La réduction du pyruvate par la lactate déshydrogénase permet la régénération des NADH produits au cours de la glycolyse (figure 6). Cette fermentation se fait avec un bilan théorique de 2 moles de lactate et 2 moles d'ATP par mole de glucose fermentée. Il faut noter toutefois que certaines espèces produisent en plus de faibles quantités de formate, d'éthanol et d'acétate. Ces produits secondaires peuvent cependant devenir importants dans certaines conditions de culture.

Les bactéries hétérolactiques utilisent la voie de la phosphocétolase et cette voie conduit à un bilan théorique de 1 mole de lactate, 1 mole de CO<sub>2</sub>, 1 mole éthanol et 1 mole d'ATP par mole d'hexose fermentée. De faibles quantités d'acétate et de glycérol sont parfois formées (figure 7).



**FIGURE n° 7 - FERMENTATION HETEROLACTIQUE**

- (1) voie de la Phosphocétolase; (2) lactate déshydrogénase;  
 (3) acétaldéhyde déshydrogénase; (4) alcool déshydrogénase;  
 (5) acétate kinase.

### C.1.2.- La régulation de la LDH:

La LDH est présente sous deux formes: la L(-) lactate déshydrogénase et la D(+) lactate déshydrogénase, responsables respectivement de la formation des isomères L(-) et D(+) du lactate. Ces enzymes ont des pH optima d'activité différents. La L(-) LDH est plus active à pH basique : 7,3-8,0 (GASSER et al., 1970) tandis que la D(+) LDH est active à pH acide: 5,3 (JONAS et al., 1972 ; HENSEL et al., 1977 ; GASSER et al., 1970).

De nombreux auteurs ont étudié la régulation de la production de lactate par les bactéries homolactiques . Chez la plupart de ces bactéries, cette production est en effet fonction des conditions de culture, et régulée par le pH (GUNSALUS et NIVEN, 1942 ; STAMER, 1979) et la concentration en sucres (DE VRIES et al., 1970 ; STAMER, 1979).

Chez de nombreuses espèces l'activité de la LDH est dépendante du taux intracellulaire de fructose di-phosphate (WALLNOFER et BALDWIN, 1967). C'est le cas de L. casei et L. curvatus (DE VRIES et al., 1970 ; THOMAS et al., 1979 ; HENSEL et al., 1977), certaines souches de Streptococcus mutans (YAMADA et CARLSON, 1975), S. cremoris (JONAS et al., 1972 ; CROW et PRITCHARD, 1977), Thermus caldophilus (TAGUECHI et al., 1982), S. lactis (THOMAS et al., 1979), Bifidobacterium sp. (DE VRIES et STOUTHAMER, 1968) et Thermoanaerobium brockii (LAMED et ZEIKUS, 1980b). Or le taux de FDP est fonction de la concentration en substrat (YAMADA et CARLSON, 1975 ; THOMPSON, 1978 ; WADDINGTON et MEANY, 1981). En substrat limitant, bien que la concentration en LDH ne varie pas, le pool de FDP est alors trop faible pour permettre une activation de cette enzyme. D'autre part, l'effet activateur du FDP est d'autant plus marqué que le pH est acide. Chez des Streptocoques, à pH basique, la concentration en FDP nécessaire pour activer la LDH est en effet plus importante qu'à pH acide (GUNSALUS et NIVEN, 1942 ; HENSEL et al., 1977). Chez certaines espèces par contre (Lactobacillus sp.) le pH n'a pas d'influence sur l'activité de la LDH (BLICKSTAD, 1983).

Chez les bactéries homolactiques, la pyruvate formate lyase est induite quand le substrat est limitant (THOMAS et al., 1979), permettant ainsi un gain net d'ATP par formation d'acétate. Les produits annexes formés dans ces conditions (acétate, éthanol, et formate) peuvent atteindre jusqu'à 40% des produits (GUNSALUS et NIVEN, 1942). Certaines souches de S. lactis ne possèdent pas de pyruvate formate lyase, et leur métabolisme n'est pas modifié en fonction de la concentration en substrat (THOMAS et al., 1979). La pyruvate formate



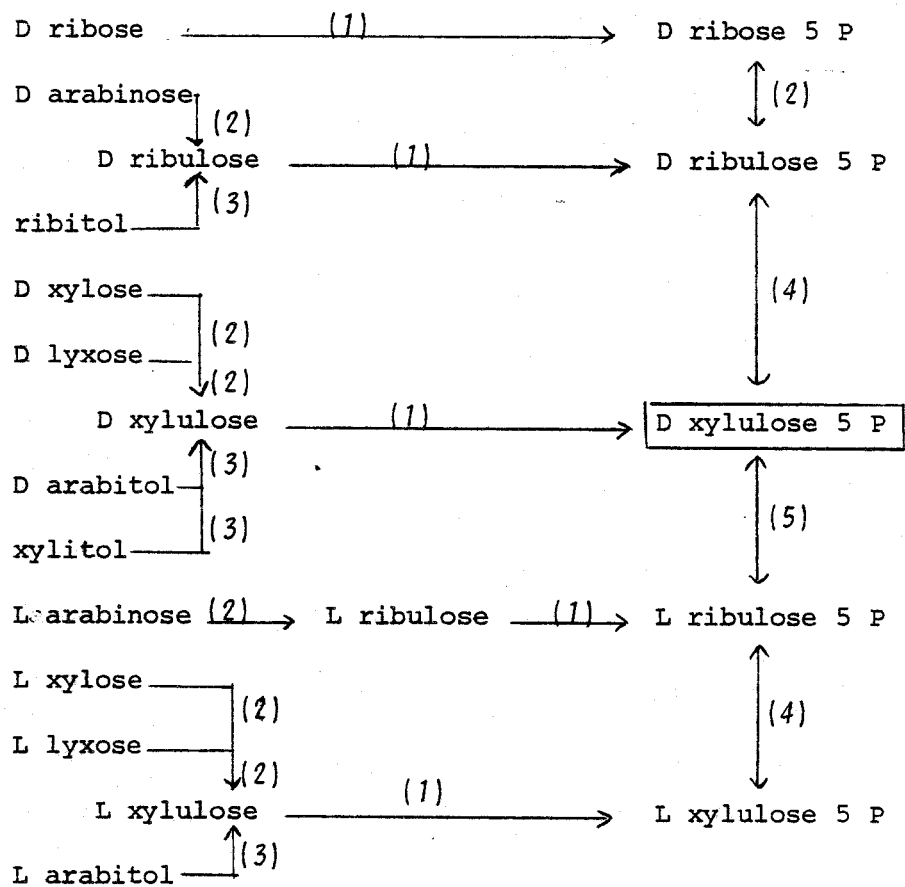


FIGURE n° 8 - VOIES D'ENTREE DES PENTOSES

(1) kinase; (2) isomérase; (3) déshydrogénase; (4) 3-épimérase  
 (5) 4-épimérase.

lyase est inhibée par le glycéraldéhyde 3-P (THOMAS et al., 1979). Ceci explique alors que ces bactéries passent d'une fermentation mixte à une fermentation lactique lorsque la concentration en substrat augmente.

Chez d'autres espèces, la LDH n'est pas dépendante du taux de FDP. C'est le cas de certaines souches de S. mutans et S. bovis (YAMADA et CARLSON, 1975), S. ruminantium (WALLACE, 1978), certaines souches de Lactobacilles (GASSER et al., 1970) et les bactéries du rumen (COUNOTTE et al., 1980 ; COUNOTTE et PRINS, 1981). Chez de telles espèces bactériennes, la régulation de la LDH peut se faire alors par les concentrations en pyruvate, en ATP, et en NADH, qui sont aussi dépendantes de la concentration en substrat (THOMAS et al., 1979 ; COUNOTTE et al., 1980 ; MATTIN et GOTTSCHAL, 1976).

L'ATP peut toutefois être inhibiteur de la LDH, comme c'est le cas chez S. ruminantium (WALLACE, 1978). De même, l'AMP et l'ADP inhibent certaines LDH bactériennes (YAMADA et CARLSON, 1975) et le pyruvate inhibe la LDH du muscle (WADDINGTON et MEANY, 1981).

D'autres paramètres influencent l'activité de la lactate déshydrogénase. Le phosphate inorganique peut être un activateur de la LDH (ROW et PRITCHARD, 1977) comme c'est le cas chez S. cremoris (WOLIN, 1964), ou bien un inhibiteur comme chez Streptococcus sp. (THOMAS et al., 1979 ; YAMADA et CARLSON, 1975). De même, le phospho-énol pyruvate peut être inhibiteur de la LDH (YAMADA et CARLSON, 1975). Or la concentration en PEP est importante lorsque les cellules se retrouvent en substrat limitant. D'autre part, les LDH des Lactobacilles (L. casei et L. curvatus) sont dépendantes de la teneur en ions métalliques  $Mn^{++}$  et  $Cu^{++}$  (HENSEL et al., 1977 ; DE VRIES et al., 1970).

La plupart des bactéries lactiques sont anaérobies facultatives, et certaines souches en conditions d'anaérobiose stricte, restent homolactiques même en substrat limitant (THOMAS et al., 1979). De même, certains Lactobacillus hétérofermentaires ne produisent plus d'acétate en absence d'oxygène (BLICKSTAD, 1983).

Les rendements en lactate varient aussi en fonction de la nature du substrat fermenté. S. lactis fermente le glucose et le lactose en lactate, tandis que sur galactose la production de métabolites annexes est plus importante (BLICKSTAT, 1983). Le fructose est métabolisé en lactate par les bactéries homolactiques et en mannitol par les bactéries hétérofermentatives.

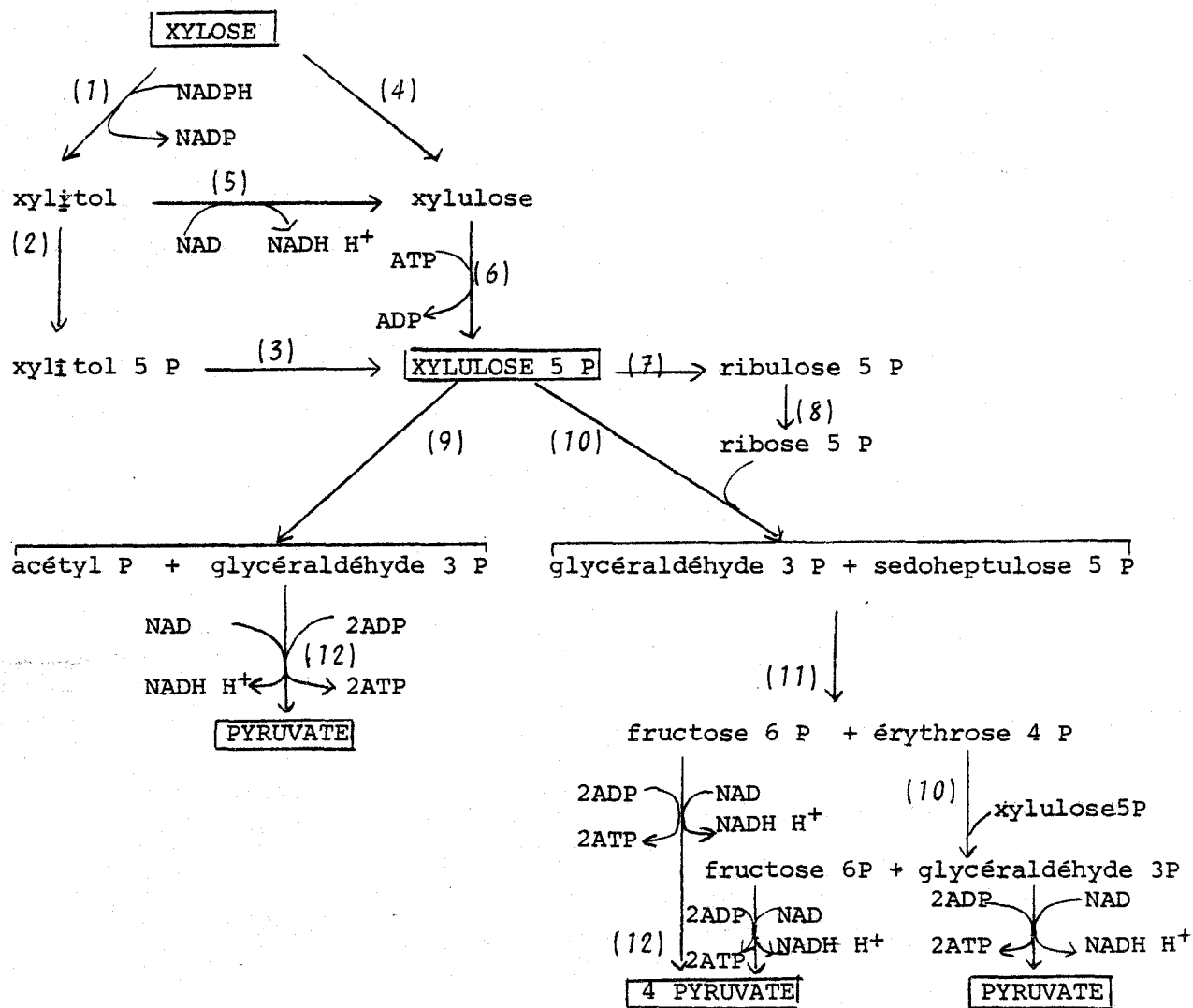


FIGURE n° 9 - VOIES DE FERMENTATION DES PENTOSES

- (1) aldose réductase; (2) PEP phosphotransférase; (3) pentitolP déshydrogénase;  
 (4) xylose isomérise; (5) déshydrogénase; (6) xylulose kinase; (7) xylulose5P  
 3 épimérise; (8) riboseP isomérise; (9) phosphocétolase; (10) transcétolase;  
 (11) transaldolase; (12) enzymes de la voie EMP.

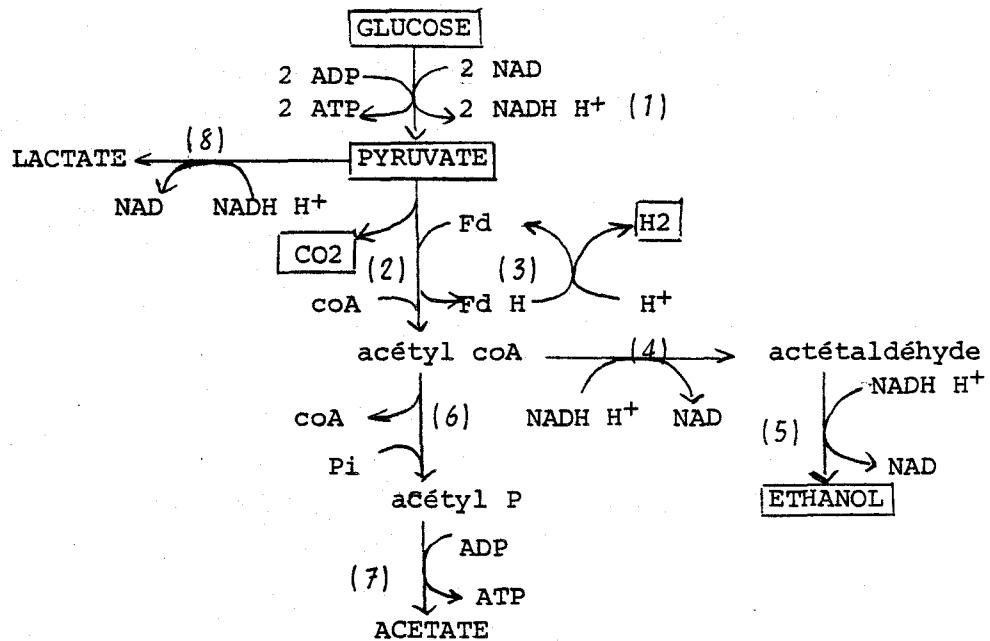
Mais surtout, la fermentation des pentoses par la majorité des bactéries homolactiques conduit à un bilan de type hétérolactique, par induction de la voie de la phosphocétolase (ANDERSON et WOOD, 1969) et sur xylose, les Bifidobactéries produisent plus d'éthanol et de formate mais moins de lactate et d'acétate (DE VRIES et STOUTHAMER, 1968).

### C.1.3.- Fermentation des pentoses (figure 9)

Tous les aldopentoses (D ribose, D arabinose, D xylose, D lyxose) de même que le L arabinose et le L xylose, sont fermentés par les microorganismes (figure 8). La plupart des bactéries fermentent les pentoses par la voie de WARBURG-DICKENS, ce qui se traduit par une production de métabolites similaire à celle sur hexoses (WOOD, 1961 ; ROSEMBERG, 1980). Les bactéries hétérolactiques fermentent les pentoses par la voie de la phosphocétolase. La seule déviation métabolique observée sur pentoses concerne les bactéries homolactiques. Celles-ci produisent en effet de grandes quantités d'acétate sur pentoses. L'induction de la voie hétérofermentaire a été étudiée, entre autre, chez L. casei (ANDERSON et WOOD, 1969) et L. pentosus (WOOD, 1961). L. casei utilise les pentitols par un système PEP phosphotransférase. Les pentitols-P sont transformés en pentulose-P par une pentitol-P déshydrogénase (qui est réprimée par le glucose). Le taux de phosphocétolase et de glucose 6-P déshydrogénase, en présence de pentose, augmente de 5 à 6 fois chez L. casei, tandis que le taux de phosphofructo-kinase et d'aldolase diminue de 2 à 3 fois (ANDERSON et WOOD, 1969).

D'autres voies de fermentation des pentoses sont utilisées par les bactéries lactiques (FUKUI et al., 1957). Des souches de L. thermophilus fermentent le L-arabinose en quantités égales de lactate et d'acétate, mais elles fermentent le xylose en quantités égales de lactate et formate. Par contre, d'autres souches de L. casei fermentent tous les pentoses en lactate et formate (FUKUI et al., 1957). Streptococcus faecalis fermente le L-arabinose et le D-ribose en lactate avec un rendement de 1,3 moles par mole de sucre fermentée (soit 73% du carbone utilisé) (FUKUI et al., 1957).

Certaines bactéries conservent donc leur métabolisme homolactique sur pentoses, et dans ce cas, elles utilisent probablement la voie de WARBURG-DICKENS. Ainsi, le rendement théorique d'une fermentation homolactique sur pentose serait de 1,7 moles de lactate par mole de substrat fermentée.



**FIGURE n° 10 - VOIE DE PRODUCTION D'ETHANOL**

- (1) voie EMP; (2) pyruvate ferredoxine oxydo-réductase  
 (3) ferrédoxine hydrogénése; (4) acétaldéhyde déshydrogénése  
 (5) alcool déshydrogénése; (6) phospho-transacétylase  
 (7) acétate kinase; (8) lactate déshydrogénése.

## C.2.- Production d'éthanol :

Les bactéries hétérolactiques utilisent la voie de la phosphocétolase, des *Pseudomonas* et *Z. mobilis* utilisent la voie d'ENTNER-DOUDOROF, mais la voie la plus répandue chez les bactéries productrices d'éthanol est la voie d'EMBDEN-MEYERHOF. Les levures et *Z. mobilis* fermentent le glucose en 2 moles d'éthanol et 2 moles de CO<sub>2</sub> par une pyruvate décarboxylase et un alcool déshydrogénase, mais chez la plupart des anaérobies la production d'éthanol s'accompagne généralement d'acétate, de lactate d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, de formate et de butyrate, en quantités variables.

Parmi ces microorganismes, *C. thermocellum* (LAMED et ZEIKUS, 1980 a), *Thermoanaerobium brokii* (BEN BASSAT et al., 1981 ; LAMED et ZEIKUS, 1980 b), *Clostridium thermohydrosulfuricum* (NG et ZEIKUS, 1982 ; WIEGEL et al., 1979), *Thermoanaerobacter acetoethylicus* (BEN BASSAT et ZEIKUS, 1981), *Thermoanaerobacter ethanolicus* (WIEGEL et LJUNGDAHL, 1981), et *Ruminococcus albus* (GLASS et al., 1977 ; MILLER et WOLIN, 1973) ont été largement étudiés.

Chez ces espèces bactériennes, la production d'éthanol se fait à partir de l'acétyl CoA, par une acétaldéhyde déshydrogénase et une alcool déshydrogénase (figure 10)

Chez *C. thermocellum*, l'alcool déshydrogénase est NAD<sup>+</sup> dépendante et inhibée par de faible concentration en éthanol et NAD<sup>+</sup>. La régulation de cette enzyme est identique chez *T. ethanolicus*, et lorsque la concentration en substrat est supérieure à 10 g/l, la production d'acétate et de lactate augmente par rapport à celle d'éthanol.

Chez *T. brockii*, par contre, cette enzyme est NAD<sup>+</sup> et NADP dépendante et réversible. *T. brockii* et *C. thermohydrosulfuricum* possèdent d'autre part une alcool aldéhyde/cétone oxydoréductase NADP spécifique, réversible et très stable à température élevée. Chez ces deux espèces, de fortes concentrations en éthanol et des températures élevées sont alors moins inhibitrices que pour *C. thermocellum* (HERRERO et GOMEZ, 1980 ; KUNDU et al., 1983).

Si les équipements enzymatiques de *T. brokii* et *C. thermohydrosulfuricum* leur permettent une meilleure production d'éthanol que *C. thermocellum*, par contre leur activité hydrogénasique est plus faible, et ces microorganismes sont inhibés par l'hydrogène. Chez *T. brockii*, cette inhibition peut être levée en présence

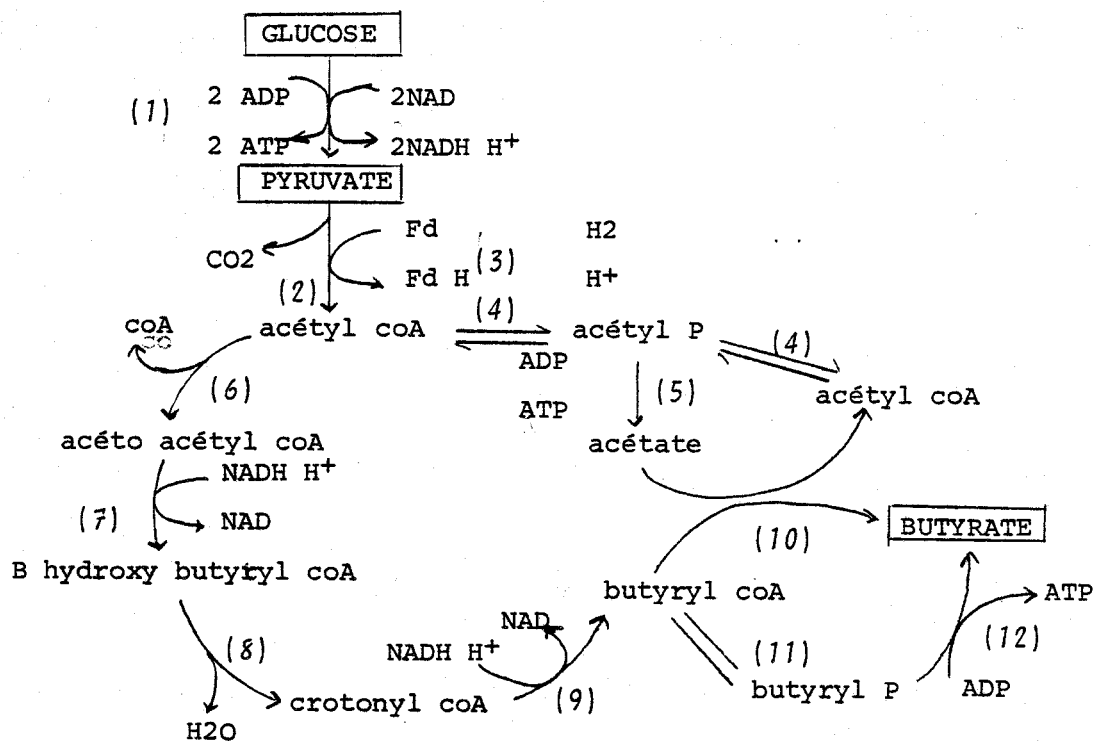


FIGURE n° 11 - VOIE DE PRODUCTION DU BUTYRATE

- (1) voie EMP; (2) pyruvate-ferrédoxine-oxido-réductase; (3) ferrédoxine-hydrogénase; (4) acétyl coA ortho phosphate acétyl transférase; (5) acétate phosphotransférase; (6) acétyl coA acétyl transférase (thiolase); (7) B hydroxy butyryl coA déshydrogénase; (8) 3 hydroxy acétylcoA hydrolase (crotonase); (9) butyryl coA déshydrogénase; (10) butyryl coA synthétase; (11) phosphotransbutyrylase; (12) butyrate kinase.

d'acétone. En effet, l'acétone, agissant comme accepteur d'électrons, est réduit en isopropanol et permet ainsi la régénération des NADH. De même, à faible pression partielle d' $H_2$  (0,3 atmosphère), la production d'acétate et d' $H_2$  cesse, par contre, la production de lactate et d'éthanol augmente permettant ainsi une régénération des NADH. A plus fortes pressions partielles d' $H_2$ , le métabolisme de cette bactérie est totalement inhibé.

### C.3.- Production de butyrate :

Ce type de fermentation a été étudié chez de nombreux Clostridia (DOELE, 1975). Une bactérie du rumen: Butyrivibrio fibrisolvens (MILLER et JENESEL, 1979) et une bactérie thermophile: Clostridium thermosaccharolyticum (SJOLANDER, 1937), utilisent les même voies de formation de butyrate (figure 11). Ces deux espèces produisent en plus de l'acétate et du lactate (JARVIS et al., 1978 ; SJOLANDER, 1937). B. fibrisolvens produit en plus du formate et a besoin de  $CO_2$  pour sa croissance (JARVIS et al., 1978).

Avec des concentrations croissantes en carbonate, la production de formate par B. fibrisolvens augmente par rapport à celle de butyrate. Les voies de formation du formate, chez cette espèce, ne sont pas encore élucidées. Le formate serait produit soit par une pyruvate synthétase et une pyruvate formate lyase, soit directement à partir du  $CO_2$ .

Chez C. thermosaccharolyticum, la fermentation butyrique est fonction du stade physiologique de la bactérie. Des études ont montré que les pentoses favorisaient la sporulation de ce microorganisme (PHEIL et ORDAL, 1967) et que contrairement au stade végétatif, au stade sporulé les cellules produisent de grandes quantités d'éthanol (HSU et ORDAL, 1970). De même, les travaux de LEE et ORDAL (1967) ont montré que C. thermosaccharolyticum ne produit pas de butyrate lorsque les cellules sont maintenues en conditions non proliférantes.



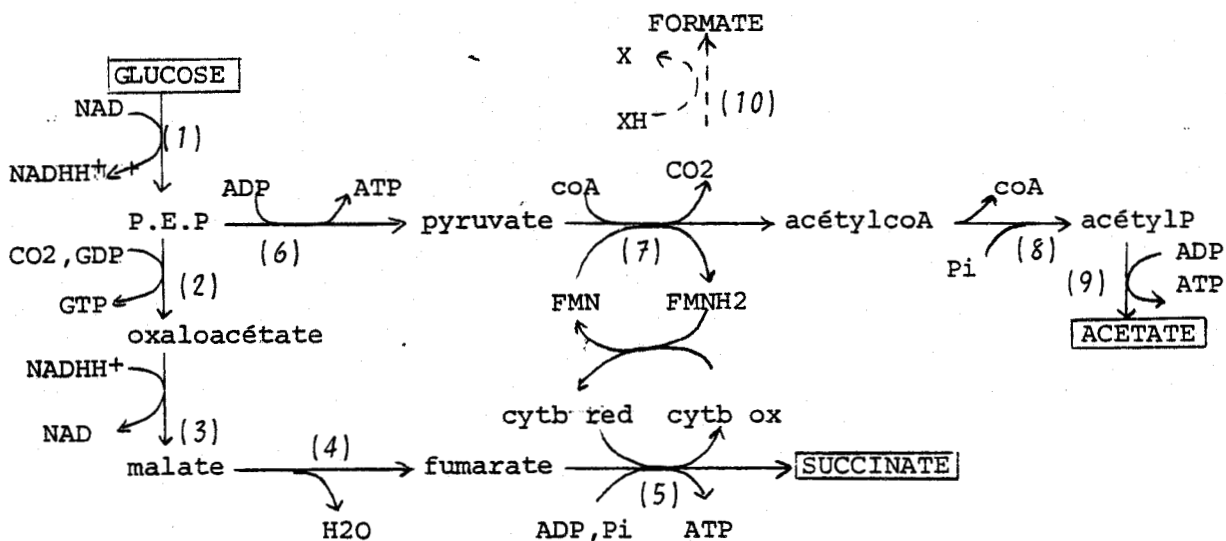


FIGURE n° 12 - VOIE DE FORMATION DU SUCCINATE

(1) enzymes de la voie EMP.; (2) GDP-PEP carboxykinase; (3) malate - dēshydrogēnase; (4) fumarase; (5) fumarate réductase; (6) pyruvate kinase; (7) dēcarboxylase; (8) phosphotransacétylase; (9) acétate kinase; (10) formate dēshydrogēnase.

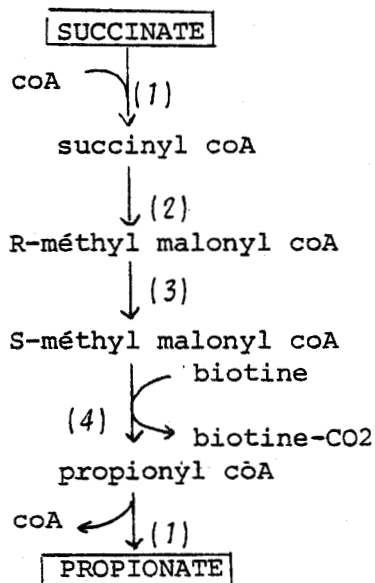


FIGURE n° 13 - VOIE DE FORMATION DU PROPIONATE

(1) coA transfērase; (2) R méthyl malonylcoA mutase; (3) méthylmalonylcoA racēmase; (4) méthyl malonylcoA- pyruvate transcarboxylase.

C.4.- Production de succinate et de propionate :

Ce type de fermentation (figure 12) a été étudié chez des espèces cellulolytiques: Bacteroides succinogenes (MILLER, 1978) et Ruminococcus flavefaciens (WOLIN et MILLER, 1982 ; HOPGOOD et WALKER, 1969), de même que chez de nombreux autres genres bactériens : Bacteroides, Veillonella, Peptostreptococcus, Succinivibrio, et Selenomonas (DOELE, 1975).

Le phospho enol pyruvate (PEP) résultant de la glycolyse par la voie EMP est décarboxylé en oxaloacétate par une GDP-PEP carboxykinase, activée en présence de carbonate. L'oxaloacétate est le principal accepteur d'électrons pour la régénération des NADH produits au cours de la glycolyse. La réduction du fumarate permet un gain d'ATP par phosphorylation d'ADP. Cette réduction se fait par une fumarate réductase associée à la paroi et cytochrome b dépendante, et chez Bacteroides fragilis, la présence d'hémine (précurseur de cyt.b) favorise la production de succinate (MACY et al., 1975). De même, en absence d'hémine la fermentation par B. succinogenes se traduit par la production de fumarate, lactate et acétate. Le pyruvate formé à partir du PEP est essentiellement le précurseur d'acétate et d'électrons pour la réduction du fumarate. Le formate est produit en petites quantités directement à partir du CO<sub>2</sub>, mais les réactions impliquées ne sont pas encore connues.

En plus de la présence d'hémine, l'atmosphère gazeuse peut jouer un rôle sur les bilans de fermentation de ces espèces. R. flavefaciens, sous une atmosphère d'azote, produit du lactate, les équivalents réducteurs produits lors de la glycolyse ne pouvant être utilisés pour la formation du succinate en absence de CO<sub>2</sub> et d'hémine.

Parmi les genres bactériens participant à la fermentation succinique, certains vont jusqu'à la production de propionate (figure 13).

Les bilans de fermentation varient en fonction de la quantité de substrat disponible (sucres, CO<sub>2</sub>). Chez B. fragilis (CASPARI et MACY, 1983), en sucre non limitant et en présence de CO<sub>2</sub>, la quantité d'acétate et de propionate produite est élevée. Par contre, en sucre limitant, la production de succinate augmente, celle d'acétate et de propionate diminue, puis il y a accumulation de fumarate et de malate. Sous une atmosphère dépourvue de CO<sub>2</sub>, la production de propionate est plus importante, même en glucose limitant, l'acétate diminue et le

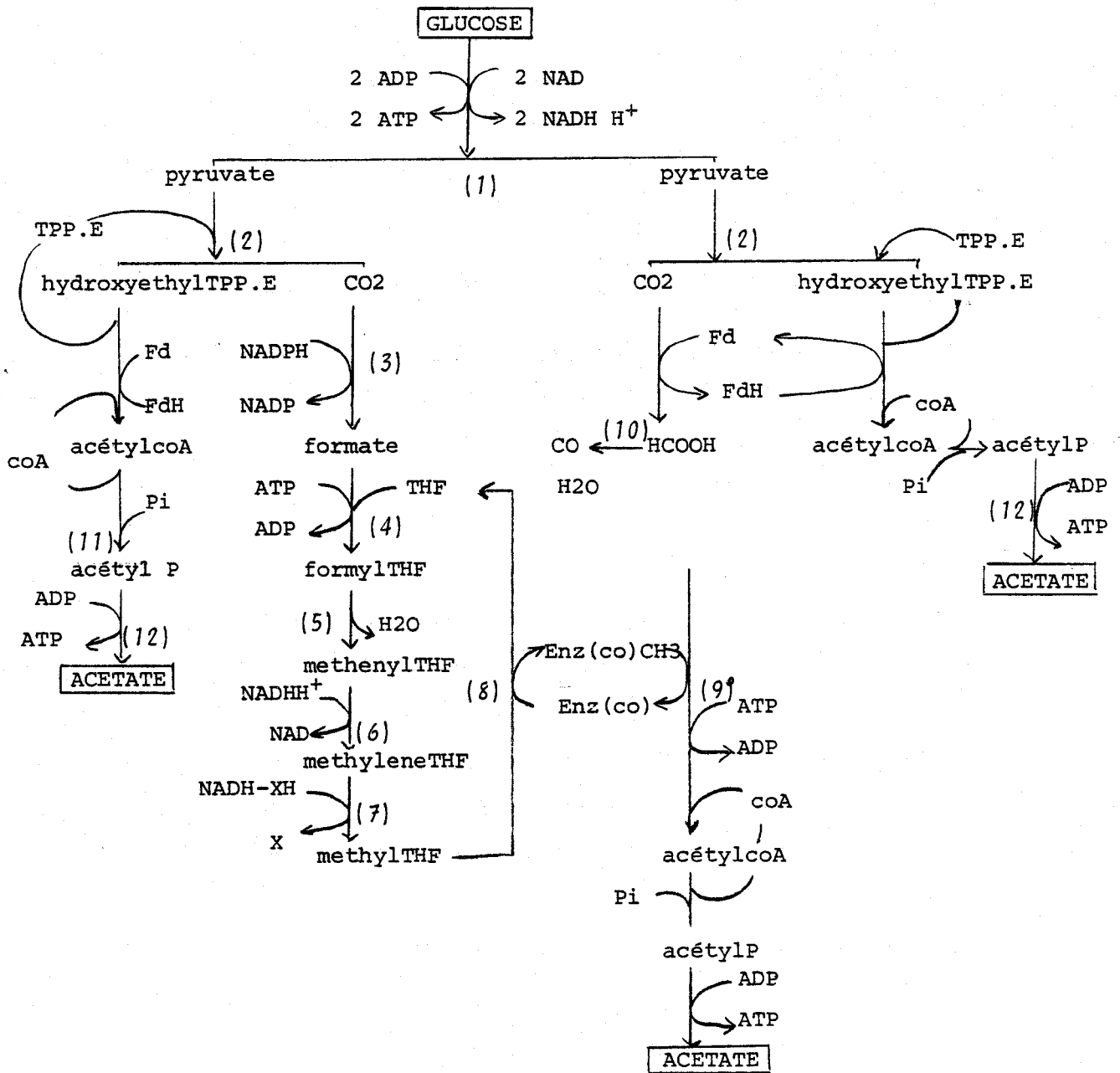


FIGURE n° 14 - VOIE DE FERMENTATION HOMOACETOGENE

- (1) enzymes de la voie EMP; (2) ferredoxine oxydo réductase; (3) formate deshydrogénase; (4) méthyl THF synthétase; (5) méthyl THF cyclo hydrolase; (6) méthyl THF deshydrogénase; (7) méthyl THF réductase; (8) méthyl transférase; (9) corrinoïde enzyme; (10) deshydrogénase; (11) phosphotransacétylase; (12) acétate kinase.

lactate augmente. Lorsque de trop faibles quantités de  $\text{CO}_2$  sont disponibles, B. fragilis modifie donc ses voies de fermentation de façon à augmenter l'activité PEP carboxykinase et la décarboxylation du succinate en propionate et  $\text{CO}_2$ , qui est ensuite réutilisé. Cette modification du métabolisme s'accompagne d'un gain supplémentaire en ATP. La méthyl-malonyl CoA décarboxylase est en effet une enzyme-biotine, liée à la paroi et catalysant un transport actif des ions  $\text{Na}^+$ . Ce gradient  $\text{Na}^+$  pourrait être, en partie, converti en gradient de protons et ainsi servir à la synthèse d'ATP.

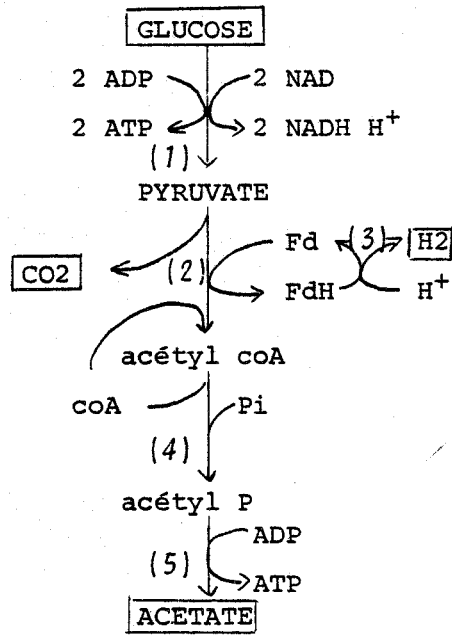
L'augmentation de la production de lactate en substrat limitant et absence de  $\text{CO}_2$ , est difficilement explicable, toutefois cette production de lactate s'accompagne d'une vitesse de consommation du substrat plus importante.

#### C.5.- Production d'acétate :

La fermentation homoacétogène a été décrite chez des bactéries thermophiles : Clostridium thermoaceticum (FONTAINE et al., 1942), Clostridium thermoautotrophicum (WIEGEL et al., 1981) et Acetogenium kivui (LEIGH et al., 1981) et des bactéries mésophiles : Clostridium formicoaceticum (ANDREESEN et al., 1970), Acetobacterium woodii (BRAUN et GOTTSCHALK, 1981) et Clostridium aceticum (BRAUN et al., 1981). Ces dernières à la différence des thermophiles, utilisent préférentiellement le fructose au glucose. De plus, ces bactéries, à l'exception de C. thermoaceticum et C. formicoaceticum, sont capables de mener une fermentation homoacétogène à partir d' $\text{H}_2/\text{CO}_2$ .

Les enzymes impliquées dans l'homoacétogénèse à partir des sucres (figure 14) ont été particulièrement bien étudiées chez C. thermoaceticum (DRAKE, 1982 a et b ; DRAKE et al., 1980, 1981 ; HU et al., 1982 ; ANDREESEN et al., 1973). Le rendement théorique de cette fermentation est de trois moles d'acétate et 3 moles d'ATP par mole de glucose fermentée.

Ce bilan peut varier en fonction de la phase de croissance. Par exemple, C. formicoaceticum ne forme que de l'acétate pendant la phase exponentielle de croissance, mais forme 1 mole de formate pour 2 moles d'acétate durant la phase stationnaire (ANDREESEN et al., 1970). Ce second type de fermentation permet donc un gain supplémentaire d'une mole d'ATP.



**FIGURE n° 15 - VOIE DE FORMATION DE L'ACETATE**

(1) voie EMP; (2) pyruvate ferredoxine oxydo réductase; (3) hydrogénase;  
 (4) phosphotransacétylase; (5) acétate kinase.

D'autre part, certaines espèces, comme A. woodii, produisent en plus de l'hydrogène lorsque les cultures se font sous une atmosphère de 100% d' $N_2$  (BRAUN et GOTTSCHALK, 1981). Cette production d' $H_2$  est faible en culture pure, elle a surtout été mise en évidence par la coculture d'A. woodii et de bactéries méthanogènes hydrogénophiles : la fermentation se traduit alors par la production de 2 moles d'acétate, 1 mole de  $CO_2$  et 1 mole de  $CH_4$  (WINTER et WOLFE, 1980).

Chez la majorité des bactéries anaérobies, la production d'acétate est accompagnée de synthèse d'éthanol, lactate et  $H_2/CO_2$ . Cette production se fait à partir de l'acétyl CoA sous l'action d'une phosphotransacétylase et d'une acétate kinase (figure 15).

Lors de la fermentation d'une molécule d'hexose, 2 moles d'ATP sont fournies au cours de la glycolyse par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS, et une mole d'ATP supplémentaire est fournie lors de la production d'une mole d'acétate à partir d'une mole de pyruvate. Par contre lors de l'excrétion de molécules plus réduites (éthanol, lactate), la cellule ne dispose que des 2 moles d'ATP produites au cours de la glycolyse.

SUBSTRATS	MICROORGANISME	PRODUITS DE FERMENTATION	BACTERIE ASSOCIEE	BILAN	REF.
cellulose	R. albus	A,E,F,	V. succinogenes	A,S	IANNOTI et al, 1973
cellulose	R. flavefaciens	A,S,F,	M. ruminantium	A, CH4	LATHAN et WOLIN, 1977
cellulose	C. thermocellum	A,E,L,B,	M. thermoautotrophicum	A,L,B,	WEIMER et ZEIKUS, 1977
cellulose	A. cellulolyticus	A,E,L,	M. barkeri	A,CH4	KHAN, 1980
cellulose	A. cellulolyticus	A,E,L,	Desulfovibrio sp.	A,	LAUBE et MARTIN, 1981
cellulose	cellulolytique sp.	A,E,L,F,	Desulfovibrio sp.	A,	LOKA-BHARATI et al, 1982
cellulose	Neocallimastix sp.	A,E,	Methanobrevibacter sp.	A,	BAUCHOP et MOUNTFORT, 1981
glucose	Selenomonas ruminantium	A,P,L,	méthanogène	A,	SCHEIFINGER et al, 1975; CHEN et WOLIN, 1977; WOLIN et MILLER, 1982
cellulose	B. succinogenes	A,S,	S. ruminantium	A,P	SCHEIFINGER et WOLIN, 1973
cellulose	C. thermocellum	A,E,L,	C. thermohydrosulfuricum	E,	NG et al, 1981
cellulose	clostridium sp.	A,E,L,	C. acetobutylicum	B,	PETIT-DEMANGE et al, 1983
cellulose	A. cellulolyticus	A,E,L,	C. saccharolyticum	A,	BEN-BASSAT et al, 1981

SUBSTRAT	MICROORGANISME	PRODUITS DE FERMENTATION	BACTERIES ASSOCIEES		BILAN	REF.
			I	II		
cellulose	Neocallimastix sp.	E,A,	Methanobrevibacter sp.	Methanosarcina sp.	CH4	MOUNTFORT et al, 1982
cellulose	A. cellulolyticus	A,E,L,	Desulfovibrio sp.	Methanosarcina sp.	CH4	LAUBE et MARTIN, 1981
glucose	C. butyricum	M,A,B,E,	Methanosarcina barkeri		CH4	SCHINK et ZEIKUS, 1982
glucose	Desulfovibrio bifidus	E,A,L,	Desulfovibrio desulfuricans	Methanosarcina sp.	CH4	WINTER, 1980
lactate	Desulfovibrio sp.	A	Methanobrevibacter sp.	Methanosarcina sp.	CH4	McIVERNEY et BRYANT, 1981 CAPPENBERG, 1975

TABLEAU n° 9 - EXEMPLES D'ASSOCIATIONS BACTERIENNES AVEC DES BACTERIES HYDROGENOPHILES OU FERMENTATIVES -

### III.- INTERACTIONS BACTERIENNES

Au sein des écosystèmes anaérobies méthanigènes, la dégradation des polymères végétaux se fait sous l'action combinée de trois grands groupes bactériens (bactéries hydrolytiques, fermentatives et méthanigènes) entre lesquels se crée une véritable chaîne alimentaire. Les interactions bactériennes ont été étudiées dans quelques digesteurs (URIBELARREA et PAREILLEUX, 1981 ; WINTER et COONEY, 1980 ; KHAN et TROTTIER, 1978 ; KHAN et MES-HARTREE, 1981) et surtout dans le rumen (WOLIN, 1974, 1979 ; WOLIN et MILLER, 1982). Ce biotope est en effet très complexe et l'hydrolyse et la digestion des végétaux dans cet écosystème ne se font qu'en présence d'une flore abondante et très diversifiée (FONTY et al., 1983 a et b).

Les complémentarités bactériennes sont d'une part de natures nutritionnelles (complémentarités hydrolytiques et fermentatives) et d'autre part métaboliques (transfert d'hydrogène entre espèces).

#### A.- INTERACTIONS NUTRITIONELLES

L'action synergique d'une association bactérienne peut provenir d'une complémentarité des besoins nutritionnels. De nombreuses bactéries isolées d'écosystèmes anaérobies ont en effet besoin de facteurs de croissance connus ou inconnus. Des bactéries cellulolytiques du rumen ont un besoin absolu de vitamines, d'acides gras ramifiés et de CO<sub>2</sub> (SCOTT et DEHORITY, 1965; GOMEZ-ALARCON et al., 1982 ; HUNGATE et STACK, 1982), qui leur sont fournis par les bactéries fermentatives comme B. amylogenes (MIURA et al., 1983). Chez les bactéries méthanogènes, la croissance de M. ruminantium est dépendante du Coenzyme M (acide mercapto-2 ethane sulfonique) (BALCH et WOLFE, 1976 ; TAYLOR et al., 1974). Acetivibrio cellulolyticus est dépendant de la teneur en sulfure du milieu (PATEL et al., 1982). Et récemment, une souche fermentant l'éthanol en propionate a été isolée (SAMAIN et al., 1982). Cette bactérie présente une étroite dépendance nutritionnelle vis à vis d'une bactérie homoacétogène, qui peut être levée par l'addition de jus de rumen dans le milieu de culture.



Les interactions bactériennes ont surtout été étudiées dans le but d'établir des associations stables complémentaires au niveau de l'utilisation des substrats. Les principales associations réalisées entre bactéries hydrolytiques et bactéries fermentatives sont regroupées au tableau 9. De telles associations peuvent conduire à une compétition pour l'utilisation du substrat et donc une vitesse de dégradation plus lente de la cellulose : c'est le cas de la coculture de A. cellulolyticus et C. saccharolyticum (KHAN et MURRAY, 1982 b). Mais l'association d'une bactérie fermentative peut être bénéfique lorsque, par l'utilisation des sucres résultant de l'hydrolyse, elle permet de lever l'inhibition des cellulases (KHAN et MURRAY, 1982 b). La fermentation des sucres libérés au cours de la cellulolyse peut d'autre part permettre de diriger la dégradation de la cellulose vers la production d'un métabolite préférentiel, en fonction de la bactérie fermentative associée à la bactérie hydrolytique (tableau 9).

#### B.- TRANSFERT D'HYDROGENE INTER-ESPECES

Une des conséquences les plus importantes des interactions entre bactéries fermentatives et bactéries hydrogénophiles (méthanogènes, sulfato-réductrices, homoacétogènes à partir d' $H_2/CO_2$ ), est la déviation des voies métaboliques de fermentation par transfert d'hydrogène entre les espèces. Cette déviation intervient chez les bactéries possédant une NADH ferredoxine-oxydo-réductase et une ferredoxine hydrogénase, et qui peuvent régénérer leurs coenzymes réduits en produisant de l'hydrogène (WOLIN, 1975 ; LE GALL, 1978). Le transfert des électrons des pyridines nucléotides réduites sur les protons via la ferredoxine est thermodynamiquement défavorable dans les conditions standards ( $E'^{\circ} NADH/NAD^+ = -0,32 V$ ,  $E'^{\circ} H_2/H^+ = -0,42 V$ ). Cette réaction devient possible à faible pression partielle d'hydrogène. Dans ce cas, les NADH ne sont plus disponibles pour la synthèse de lactate à partir du pyruvate et d'éthanol à partir de l'acétyl coA, tout le métabolisme est alors dévié vers la production d'acétate. Le rendement énergétique de la fermentation est ainsi amélioré.

Le transfert d'hydrogène inter-espèces rend possible la dégradation des acides organiques par les sulfato-réductrices (Mc INERNEY et BRYANT, 1981 ; CAPPENBERG, 1975), de l'éthanol par l'organisme S (BRYANT et al., 1976) par Desulfobulbus propionicus

(LAANBROECK et al., 1982) et par T. brockii (BEN BASSAT et al., 1981), lorsque ces bactéries sont cultivées en présence de méthanogènes. De même la dégradation des acides aminés peut se faire en absence de glycine ou de proline (accepteur d' $H^+$  dans la réaction de Stickland) mais en présence de méthanogènes (NAGASE et MATSUO, 1982).

L'influence de la coculture avec une bactérie hydrogénéophile a surtout été étudiée chez des bactéries hydrolytiques (tableau 9) d'une part dans le but d'augmenter la vitesse d'hydrolyse de la cellulose, en raison du meilleur rendement énergétique pour les bactéries et d'autre part de lever l'inhibition de la croissance par l'hydrogène.

Cependant certaines bactéries ne produisent pas d' $H_2$  à partir des NADH et leur métabolisme n'est pas altéré par la pression partielle d'hydrogène, comme c'est le cas pour B. succinogenes (WOLIN et MILLER, 1982).

## CONCLUSIONS

-\*-

Il apparaît alors que si la dégradation des polymères végétaux est plus rapide par les cultures mixtes méthanigènes (SCHARER et MOO-YOUNG, 1979 ; WINTER et COONEY, 1980) que par des cultures pures, ceci peut être dû : au meilleur rendement en ATP permettant une meilleure croissance des bactéries hydrolytiques et à la levée d'une inhibition potentielle par l'hydrogène, mais aussi à l'action complémentaire et synergique des bactéries hydrolytiques et fermentatives.

Etant donné la complexité des substrats naturels, il s'avère donc comme essentiel d'obtenir des associations stables permettant une dégradation totale de ces substrats.

Il convient alors de disposer de souches bactériennes ayant des activités hydrolytiques et fermentatives complémentaires, et éventuellement de disposer de souches dont le métabolisme permette d'orienter la dégradation des polymères végétaux vers la production d'un métabolite particulier, industriellement intéressant.

Si les microorganismes (comprenant des hydrolytiques et des fermentatives) isolés du rumen sont nombreux et relativement bien étudiés, très peu de bactéries anaérobies strictes ont été isolées d'autres écosystèmes. De plus les études concernant l'écologie et la physiologie des bactéries thermophiles sont très restreintes.

De façon à ne pas nous limiter aux espèces déjà décrites, nous avons donc entrepris d'isoler des bactéries hydrolytiques mésophiles et thermophiles (cellulolytiques, hémicellulolytiques et amylolytiques) à partir d'écosystèmes variés. Le métabolisme et la capacité hydrolytique de ces isolats ont été étudiés comparativement en cultures pures et en cultures mixtes reconstituées. Ceci dans le but, d'une part, d'élucider en partie les différentes étapes d'hydrolyse intervenant dans les écosystèmes méthanigènes, et d'autre part, d'obtenir des cultures bactériennes performantes susceptibles de dégrader activement les résidus des Industries Agro-Alimentaires.

-\*-\*-\*-\*-\*-\*-\*-\*-\*-\*

## MATERIELS ET METHODES

\*\*\*\*\*

	K 1	K 2	KYEM
solution I	50	50	50
solution II	10	10	10
solution d'AGV	1	-	-
solution d'hémine	10	-	-
solution de vitamines	5	5	5
jus de rumen	40	-	-
extrait de levure	0,5	0,5	0,5-5
NH <sub>4</sub> Cl	0,5	0,5	0,5
hydrolysats de caseine	0,5	0,5	0,5
résazurine (à 0,2%)	1	1	1
cystéine HCl (à 2,5%)	20	20	20
KHCO <sub>3</sub>	4,5	4,5	-
MOPS	-	-	20
atmosphère gazeuse	N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>

TABLEAU n° 10 - COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES UTILISES (en ml ou g/l)

*Solution I:* KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,6%; NaCl: 1,2%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,24%; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,16%.

*Solution II:* Acide nitriloacétique: 1,28%; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,02%; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O: 0,01%; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0,017%; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,01%; ZnCl<sub>2</sub>: 0,01%; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,0025%; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 0,001%; Na Molybdate: 0,001%; NaCl: 0,1%; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,0026%; NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0,0024%.

*Solution de vitamines:* biotine: 2 mg/l; acide folique: 2 mg/l; B<sub>6</sub>HCl: 1 mg/l; B<sub>2</sub>: 5 mg/l; acide nicotinique: 5 mg/l; acide panthoténique: 5 mg/l; B<sub>12</sub> cristalline 0,1 mg/l; acide para amino benzoïque: 5 mg/l; acide lipoïque: 5 mg/l.

( d'après ZEIKUS et HENNING, 1975)

*Solution d'AGV:* acide isobutyrique: 4%; acide isovalérique: 4%, acide n-valérique: 4%, acide 2-méthyl butyrique: 4%.

(d'après GIESECKE, 1968)

## I.- MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURE

Les techniques anaérobies de HUNGATE, modifiées par MILLER et WOLIN (1973b) ont été utilisées pour la préparation des milieux et les cultures bactériennes de routine. Sauf précisions contraires, les conditions d'incubation ont été de 65°C en thermophilie, et de 35°C en mésophilie, sous une atmosphère gazeuse de  $N_2/CO_2$  (85/15), à pH 7,2 - 7,4.

Le milieu CBBM (ZEIKUS et HENNING, 1975) est utilisé comme milieu de base, les modifications apportées sont regroupées au tableau 10.

Les polysaccharides (cellulose, xylane, amidon, etc ...) sont ajoutés avant autoclavage tandis que les substrats solubles sont ajoutés au milieu de base stérile sous forme de solutions mères stérilisées par filtration (filtre Millipore 0,22  $\mu$ ).

L'isolement et la purification des souches ont été réalisés par étalement sur boîtes de Pétri en chambre anaérobie sous une atmosphère gazeuse  $N_2/CO_2/H_2$  (75/15/10). L'incubation des boîtes de Pétri a été faite en jarres anaérobies à 60°C ou 35°C sous la même atmosphère gazeuse.

## II.- ENRICHISSEMENTS ET ORIGINE DES INOCULA

Les enrichissements ont été réalisés dans des flacons de 100 ml (40 ml de milieu).

Deux séries d'enrichissement ont été faites en parallèle, à 35°C et 65°C, sur cellulose et xylane (5 g/l). Dans chaque cas, 5 à 7 transferts (5% V/V) ont été réalisés à une semaine d'intervalle.

Les 17 inocula utilisés proviennent de 6 écosystèmes : (I) digesteurs mésophiles de lentilles d'eau, (II) et (III) digesteurs polysubstrats respectivement à 35°C et 55°C, (IV) fumier de bovin, (V) sédiment de rivière présentant une décomposition active de la matière organique, (VI) sédiment d'une mare sulfureuse.

### III.- SUBSTRATS

La cellulose utilisée est du papier filtre Whatman N° 1 ou de la poudre de papier filtre finement broyée (Whatman CC 31). Le xylane de mélèze et les autres sucres viennent de SIGMA, MERCK ou PROLABO.

### IV.- METHODES ANALYTIQUES

IV.1.- Les sucres totaux sont dosés par la méthode colorimétrique à l'antrone sulfurique (DREYWOOD, 1946, modifiée par LOEWUS, 1952) sur une chaîne TECHNICON à flux continu.

IV.2.- Les sucres réducteurs sont dosés, soit par la méthode colorimétrique au dinitrosalicylate et lecture à 540 nm (MILLER et al., 1960), soit par la méthode colorimétrique au ferricyanure et lecture à 420 nm, automatisée sur une chaîne à flux continu TECHNICON (PORTER et SAWYER, 1972).

IV.3.- Les sucres sont séparés et dosés par chromatographie liquide haute pression WATERS sur une colonne MERCK Licrosorb NH<sub>2</sub> (25 cm x 4 mm, granulométrie 5 μ), éluant acétonitrile/eau (75/25) à 1,2 ml/mn. La détection se fait par un réfractomètre WATERS R 420.

IV.4.- Le formate est déterminé par la méthode colorimétrique de LANG et LANG (1972).

IV.5.- Les acides gras volatils et les alcools sont séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe VARIAN 3700, détecteur à ionisation de flamme).

- colonne en acier inoxydable (2,50 m x 1/8") remplie de chromosorb W.A.W. 100-120 Mesch imprégné à 25% de N.P.G.A. (néopentyl glycol adipate) et de 2% d'acide phosphorique.

- gaz vecteur N<sub>2</sub>, saturé en acide formique (débit 30 ml/mn).

- température de l'injecteur et du détecteur : 230°C.

- température de la colonne : soit 160°C pour la séparation des acides gras volatils ; soit avec une programmation linéaire de température (80°C-5mn, 25°C/mn, jusqu'à 180°C) pour la séparation des alcools
- L'injection est automatique (volume de 1,0 µl), la détermination quantitative des alcools et AGV se fait par la méthode d'étalonnage externe.

IV.6.- Les acides organiques (lactate et succinate) sont séparés et dosés par chromatographie liquide haute pression :

- colonne à compression radiale pack C18 WATERS (10 x 0,8 cm).
- éluant : tampon phosphate  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,2 M, pH 3, débit de 1,3 ml/mn.
- la détection se fait en ultra violet, à 210 nm.

Les isomères L(-) et D(+) du lactate sont déterminés par la méthode enzymatique. Les lactate déshydrogénases et le  $\text{NAD}^+$  sont des produits BOEHRINGER.

IV.7.- Les gaz sont séparés et dosés par chromatographie gaz-solide (chromatographe Pye UNICAM, détecteur à conductivité thermique) :

- colonne en acier inoxydable (2 m x 1/4"), remplie de Porapak S.
- température de la colonne de 50°C, température de l'injecteur et du détecteur respectivement de 60°C et 100°C.
- gaz vecteur azote, pour la séparation et le dosage de l'hydrogène, du méthane et du gaz carbonique.
- gaz vecteur hélium, pour la séparation et le dosage de l'azote, du méthane et du gaz carbonique.

IV.8.- Le volume de gaz produit au cours d'une fermentation est déterminé par un compteur à impulsions (MOLETTA et ALBAGNAC, 1982).

IV.9.- La cellulose résiduelle est mesurée par pesée après filtration sur filtre de verre GF/F WHATMAN, et séchage à 105 °C jusqu'à poids constant.

IV.10.- La croissance bactérienne, sur substrats solubles, est suivie par turbidimétrie, spectrophotomètre PROLABO RD 320, à 580 nm en tubes anaérobies (résazurine réduite) ou à 680 nm en cuves (résazurine oxydée).



## V.- DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES POLYSACCHARIDES

V.1.- Hydrolyse acide de la cellulose (méthode SAEMAN): 10 mg de cellulose sont préhydrolysés (4h, 20°C) dans 300 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (26 N), puis hydrolysé (2,30 h, 100°C) dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 N) contenant 1 ml d'inositol (0,5%) comme étalon interne.

V.2.- Hydrolyse acide des hémicelluloses (méthode au TFA): 10 mg d'hémicellulose sont hydrolysés (1,15 h, 120°C) dans 3 ml d'acide trifluoroacétique (2 N), contenant 1 ml d'inositol (0,5%) comme étalon interne.

V.3.- Réduction des aldoses en alditols: Après neutralisation par une solution de Ba(OH)<sub>2</sub> à saturation, les hydrolysats sont évaporés sous vide et repris dans 1 ml d'H<sub>2</sub>O et 2 gouttes d'ammoniaque (à 20%). La réduction des aldoses en acétate d'alditol (2 h, 20°C) se fait par le borohydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub>, 2%). Les acétates d'alditol sont séparés et dosés sur un chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne en acier inoxydable (2 m X 1/8") est remplie de chromosorb W.A.W. DMCS 68-80 Mesch, imprégné de 1,5 % de LAC 4R 886 (polyester d'éthylène glycol). La température de la colonne suit une programmation linéaire (20°C, 15°C/mn, 225°C finale). Le gaz vecteur est l'azote à un débit de 30 ml/minute.

## VI.- DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les activités enzymatiques: carboxyméthyl cellulase (CMC ase), xylanase, et avicelase sont dosées dans les surnageants de cultures, après filtration sur filtre en fibre de verre WHATMAN GF/F : 1 ml de surnageant convenablement dilué et 0,5 ml d'eau distillée sont ajoutés à 1,5 ml de tampon citrate (0,1 M, pH 5,5) contenant 10 g/l du substrat.

Après 10 à 30 mn d'incubation (pour les activités CMCase et xylanase) et 1 h (pour les activités papier filtre et avicelasique), les sucres réducteurs libérés sont dosés par la méthode au D.N.S.. La

température d'incubation est fixée à 35°C pour les enzymes de microorganismes mésophiles, et à 60°C pour les hydrolases de bactéries thermophiles.

Une unité enzymatique est exprimée en  $\mu$ mole d'équivalent glucose (ou xylose) libéré par mn et par ml.

Au cours de nos travaux, nous n'avons pas étudié les conditions optimales d'actions des enzymes. Nous nous sommes limités à l'étude de la capacité hydrolytique des surnageants de cultures en déterminant la quantité de sucres réducteurs libérée par 1 ml de milieu pendant un temps déterminé, dans les conditions indiquées. Ces activités ne seront à utiliser que de façon comparative.

### VII.- ISOLEMENT DE L'A.D.N.

L'isolement de l'A.D.N. se fait par la méthode de MARMUR (1961). La détermination du GC% s'effectue par dénaturation thermique à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur UVIKON, muni d'une programmation de température des cuves. La composition en GC% de l'A.D.N. est calculée selon la formule de DE LEY (1970), après détermination du  $T_m$  par la méthode de FERRAGUT et LECLERC (1976). La composition en base de l'A.D.N. de C. thermocellum DSM 1237 sert de témoin.

### VIII.- MICROSCOPIE OPTIQUE ET ELECTRONIQUE

VIII.1.- Microscopie optique : Les observations à l'état frais des bactéries sont faites en microscopie à contraste de phase (LEITZ) et à contraste interférentiel (NACHET NS 400).

VIII.2.- Microscopie électronique : Les études en microscopie électronique ont été faites en collaboration avec G. PRENSIER (INSERM U 142)

- Coloration négative : à l'acide phosphotungstique (1%) après séchage des cellules sur une grille parlodionnée et carbonée pendant 30". Les observations se font au microscope HITACHI HS-7S.

- Coupes ultrafines : Les cellules sont fixées pendant 1 h. par du glutaraldéhyde (1,2%) en tampon cacodylate 0,07 M (pH 7,3) contenant du rouge de ruthénium (0,05%). Elles sont ensuite lavées plusieurs fois de suite par du tampon cacodylate (0,07 M), contenant 500 mg/l de rouge de ruthénium. La post-fixation est réalisée pendant trois heures à l'acide osmique (1%) en tampon cacodylate (0,07 M) et rouge de ruthénium (500 mg/l).

L'inclusion des cellules est réalisée en résine EPON, après déshydratation par l'éthanol en concentration croissante et l'oxyde de propylène.

Les coupes sont effectuées au Porter BLUM et observées aux microscopes HITACHI HS-7S et JEOL EM 120 CX, après avoir été contrastées à l'acétate d'uranyle (20 g/l) dans l'éthanol (50% V/V) et au citrate de plomb (REYNOLDS, 1963).

#### IX.- ELECTROPHORESE DES PROTEINES BACTERIENNES

Les cellules bactériennes (100 mg) sont lysées (20 mn, 100°C) dans 1 ml de tampon Tris-HCl (0,27 M) contenant du sodium dodécyl sulfate (50 g/l), du  $\beta$  mercapto éthanol (5%, V/V) et du glycérol (20%, V/V).

L'électrophorèse sur gel des protéines bactériennes se fait en gradient linéaire (7 à 15%) de polyacrylamine, en présence de 1 g/l de SDS. La migration est réalisée à intensité constante (40 mA) ou à voltage constant (150 V) dans du tampon Tris-HCl (0,17 M) contenant de la glycine (9,6 g/l) et du SDS (1 g/l).

La coloration des gels se fait pendant 16 h par le bleu de Coomassie R (2,5 g/l), dans du méthanol (50%, V/V) et de l'acide acétique (1%, V/V). La décoloration se fait pendant 24 h dans le méthanol (50%, V/V) contenant 1% (V/V) d'acide acétique.

Les bandes protéiques sont quantifiées au densitomètre VITATRON (lecteur : 1 cm/mn ; enregistreur : 4 cm/mn).

X.- DENOMBREMENTS BACTERIENS

Le dénombrement des populations hydrolytiques dans des digesteurs a été fait après broyage au polytron (pendant 15 mn, en chambre anaérobie) et dilutions sérielles des échantillons. Trois tubes sont ensemencés par dilution. Le nombre le plus probable de bactéries est déterminé par les tables de Mc CRADY, en tenant compte non seulement de la croissance mais aussi des métabolites formés (AGV, acides organiques éthanol et produits gazeux).

XI.- SOUCHES DE REFERENCE

Clostridium thermocellum DSM 1237 (ATCC 27405), Clostridium thermosaccharolyticum DSM 571; Clostridium thermohydrosulfuricum DSM 567, et Wollinella succinogenes DSM 1740, proviennent de la collection Allemande.

Desulfovibrio sp. MS , Clostridium stercorearium, et Acetogenium kivui, nous ont été gracieusement fournis respectivement par J.G. ZEIKUS (Université du Wisconsin), N. CREUZET (L.C.B. Marseille), et J.A. LEIGH (Université de l'Illinois).

\*\*\*\*\*

RESULTATS ET DISCUSSION

-\*\*\*\*\*-

### COMPOSITION DES SUBSTRATS UTILISES

La cellulose et le xylane utilisé (poudre de papier filtre Whatman et xylane de mélèze Sigma) ont été hydrolysés respectivement par la méthode de SAEMAN et la méthode au TFA (Tableau 11).

---

: %	: rhamnose	: arabinose	: xylose	: mannose	: galactose	: glucose
: cellulose	: 0	: 6,78	: 0,40	: 0,06	: 0,04	: 92,69
: xylane	: 1,17	: 0,47	: 96,67	: 0,35	: 0,36	: 0,95

---

Tableau 11 : Analyse de la cellulose et du xylane

Les pourcentages sont ramenés à l'ensemble des sucres présents sur le chromatogramme

La cellulose Whatman (CC 31) ne contient pas de sucres solubles et l'analyse par chromatographie en phase gazeuse a mis en évidence la présence de très faibles quantités d'hémicelluloses sous forme d'arabanes (6,78% de résidus d'arabinose). D'autre part, cette cellulose a un indice de cristallinité élevé (8,1) proche de celui du coton (8,9) (CHOSSON, résultat non publié).

Le xylane de mélèze est pur à 97% et ne contient que très peu d'arabinogalactanes, mannanes et glucomannanes. Par contre, le pourcentage de sucres solubles retrouvé dans les milieux autoclavés est de 5% (en équivalent xylose), ce qui souligne la très faible solubilité de ce substrat.

Enfin, les résultats présentés pourraient laisser penser qu'il s'agit d'un homopolymère. En fait, comme tout xylane de résineux il s'agit d'un hétéropolymère contenant en plus de l'acide 4-O méthyl glucuronique, des fonctions éthers qui ne sont pas libérées par les techniques d'hydrolyse utilisées et selon HOEBLER et BRILLOUET (1984), le xylane utilisé contient environ un résidu d'acide uronique pour 7,6 résidus xyloses.

IERE PARTIE

ETUDES ECOLOGIQUE ET CINETIQUE DES POPULATIONS ADAPTEES MESOPHILES ET  
THERMOPHILES

-§-§-§-§-

I.- DENOMBREMENTS DE LA FLORE HYDROLYTIQUE DANS DES DIGESTEURS MÉSOPHILES ET THERMOPHILES

Des dénombrements des bactéries hydrolytiques ont été effectués à partir d'un digesteur mésophile (gazon, 23,5% cellulose et 20,6% hémicellulose) et d'un digesteur thermophile (déchets solides de conserveries de légumes, 9,2% cellulose et 42% hémicellulose).

		DENOMBREMENTS	
: Substrats		35°C (1)	65°C (2)
: Glucose	:	$3 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$
: Amidon	:	$10^9$	$10^9$
: Xylane	:	$10^9$	$2,4 \times 10^{10}$
: Cellulose	:	$10^9$	$2,4 \times 10^8$

Tableau 12 : Dénombrements de la flore hydrolytique dans un digesteur mésophile (1), alimenté avec du gazon et un digesteur thermophile (2) alimenté en effluents de conserverie.

Les milieux contenant 5 g/l de substrats ont été incubés 15 jours à 35°C et 65°C. Les résultats sont exprimés en nombre le plus probable de bactéries par ml.

Il apparaît que la flore hydrolytique dans de tels écosystèmes fait partie de la flore dominante et est fonction de la nature du substrat. Les bactéries cellulolytiques, amylolytiques et xylanolytiques sont en effet retrouvées en quantité équivalente à la flore fermentative totale dénombrée sur glucose. D'autre part, la flore xylanolytique est dominante dans le cas du digesteur thermophile dont le substrat est caractérisé par une composition en sucres simples et hémicelluloses importante.

En thermophilie, nous avons pu mettre en évidence une méthanogénèse de réduction dans les tubes jusqu'aux dilutions  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$ . En mésophilie, à partir du substrat glucose, la méthanogénèse a



température	substrats	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
35°C	glucose	B,A,P,CH <sub>4</sub>	B,A,P,CH <sub>4</sub>	B,A,P,CH <sub>4</sub>	A,P,	A,P,	-
	xylane	B,A,P,CH <sub>4</sub>	B,A,P,	A,P,	A,P,	A,P,	-
	amidon	A,B,	A,B,	A,B,	A,	A,	-
	cellulose	A,B,P,	A,B,P,	A,B,P,	A,	A,	-
65°C	glucose	A,B,CH <sub>4</sub>	A,B,CH <sub>4</sub>	A,B,CH <sub>4</sub>	A,B,	A,	-
	xylane	A,CH <sub>4</sub>	A,CH <sub>4</sub>	A,CH <sub>4</sub>	A	A	A
	amidon	A,CH <sub>4</sub>	A,CH <sub>4</sub>	A,CH <sub>4</sub>	A,CH <sub>4</sub>	A	-
	cellulose	A,CH <sub>4</sub>	A,CH <sub>4</sub>	A,CH <sub>4</sub>	A,CH <sub>4</sub>	-	-

TABLEAU n° 13 - ACIDES GRAS VOLATILS PRODUITS PAR LES POPULATIONS SOUS-DOMINANTES ET DOMINANTES (aux dilutions 10<sup>-5</sup> à 10<sup>-10</sup>) DE DIGESTEURS MESOPHILES ET THERMOPHILES

A: acétate; B: butyrate; P: propionate;

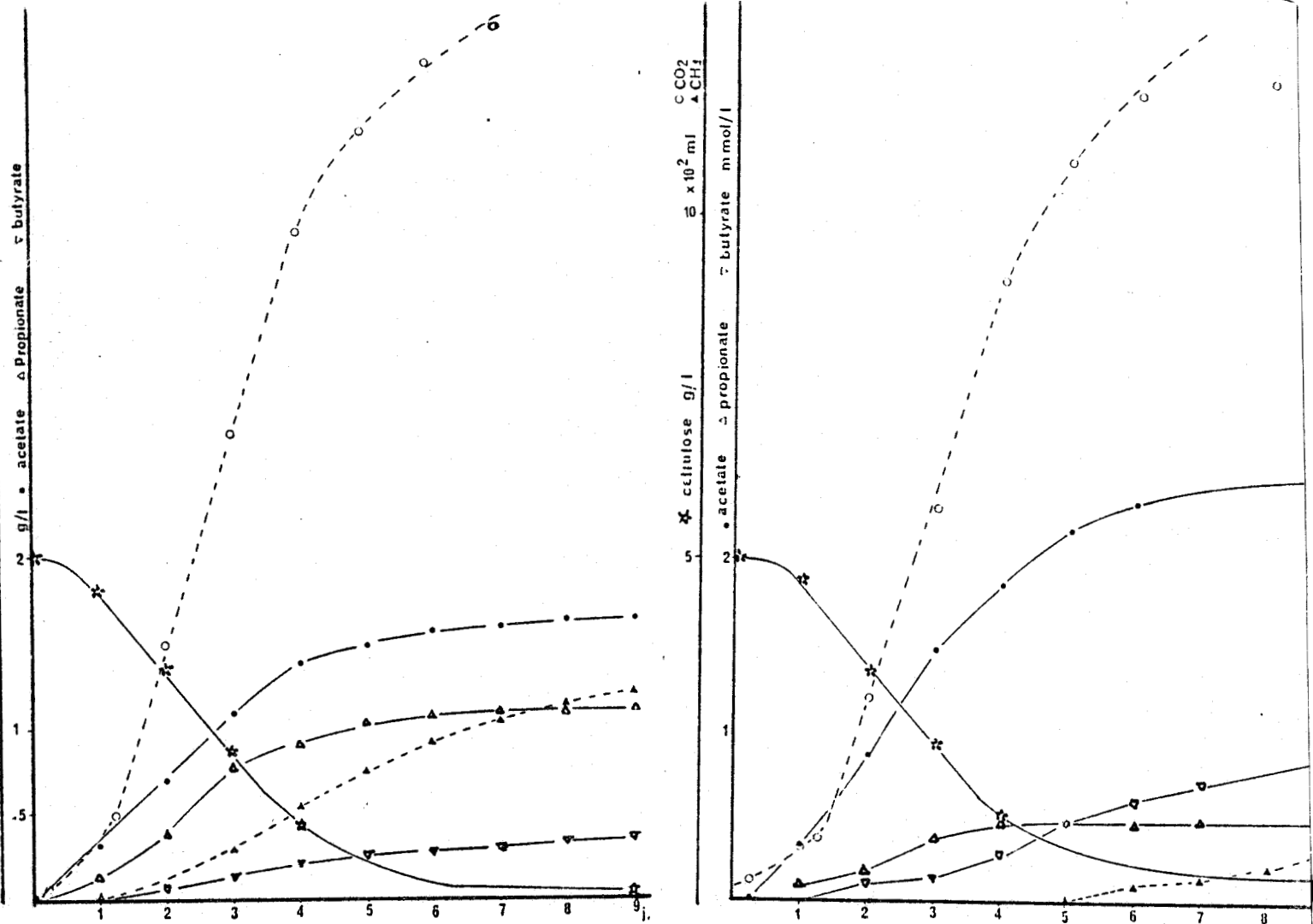
CH<sub>4</sub>: présence de méthane ( dans tous les cas, nous avons noté la présence d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>)

été observée jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ . Toutefois, ces chiffres ne donnent qu'une indication de la concentration réelle en méthanogènes hydrogénophiles puisqu'aucun dénombrement spécifique n'a été réalisé.

Dans chaque cas, la production de méthane était faible et accompagnée d'hydrogène et de gaz carbonique.

L'analyse des produits de fermentation des différents substrats par des populations plus ou moins diluées a montré qu'en mésophilie, quelque soit le substrat, la flore sous dominante produit du butyrate. Par contre, la flore dominante sur cellulose et amidon est essentiellement acétogène tandis que la flore dominante sur xylane et glucose produit en plus du propionate.

En thermophilie, nous n'avons obtenu qu'une fermentation acétique des polymères végétaux, quelque soit la dilution de la population bactérienne d'origine.



**FIGURES 16-17 -CINETIQUES DE DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR DES CULTURES D'ENRICHISSEMENTS MESOPHILES ISSUES DES ECOSYSTEMES II (figure 16) et VI (figure 17) les cinétiques ont été suivies en flacons de 500 ml (milieu K1, 5 g/l de cellulose) incubés à 35°C, sans agitation ni régulation de pH (pH initial de 7,4).**

N° de l'écosystème	Vitesse d'hydrolyse (Vmax)	transferts	Acétate	propionate	butyrate	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	$\frac{\text{ml CH}_4}{\text{ml acétate}}$
II	53,6	2°	10,2	7,7	2,3	-	20,0	1,96
		4°	27,6	15,3	4,54	65,0	14,3	0,51
VI	47,5	2°	41,7	3,8	6,8	62,0	-	0
		4°	40,83	6,76	9,5	59	3,4	9,1

**TABLEAU n° 14 - FERMENTATION DE LA CELLULOSE PAR DES CULTURES D'ENRICHISSEMENTS MESOPHILES -**

Dans tous les cas le valérate et l'iso-valérate sont présents à l'état de traces (0,03-0,07 g/l); l'éthanol, le lactate, le succinate et les sucres réducteurs ne sont pas détectables.

V max: en mg d'équivalent anhydroglucose/l/h.

## II.- DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR DES POPULATIONS ADAPTEES

Afin d'obtenir une grande variété de bactéries hydrolytiques performantes, nous avons établi des enrichissements mésophiles et thermophiles à partir d'inocula variés. Lors de la première culture d'enrichissement, nous avons observé, quelque soit l'origine du prélèvement, une hydrolyse complète de la cellulose et du xylane (5 g/l) en moins de 7 jours, à 35°C aussi bien qu'à 65°C.

### A.- DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR DES CULTURES D'ENRICHISSEMENTS MESOPHILES

Après deux puis quatre transferts successifs (5%, v/v) à une semaine d'intervalle, sur milieu K1, nous avons obtenu une fermentation complète de la cellulose (5 g/l) en 7 jours.

Le tableau 14 regroupe les bilans de fermentation de la cellulose par deux enrichissements distincts provenant d'un digesteur mésophile (écosystème II, figure 16) et de boues de mare sulfureuse (écosystème IV, figure 17). Ces deux enrichissements se distinguent par la production de méthane (enrichissement II) et d' $H_2/CO_2$  (enrichissement VI).

Quelque soit l'origine de l'inoculum, la vitesse maximale de dégradation de la cellulose est lente (47 à 54 mg de cellulose par l. et par h.) et ne varie pas entre le 2ème et le 4ème transfert.

Au cours des transferts successifs de l'enrichissement II, la production d'acétate augmente et la production de méthane diminue. La stoechiométrie de la fermentation tend alors vers le rapport théorique de conversion des glucides en acétate et méthane de réduction (0,5 mole de  $CH_4$ /mole d'acétate formée).

Par contre, quelque soit le nombre de transferts, l'inoculum provenant de l'écosystème VI a permis d'obtenir un enrichissement stable dégradant la cellulose essentiellement en acétate. A aucun moment, la production de méthane de réduction n'a pu être observée de façon significative.

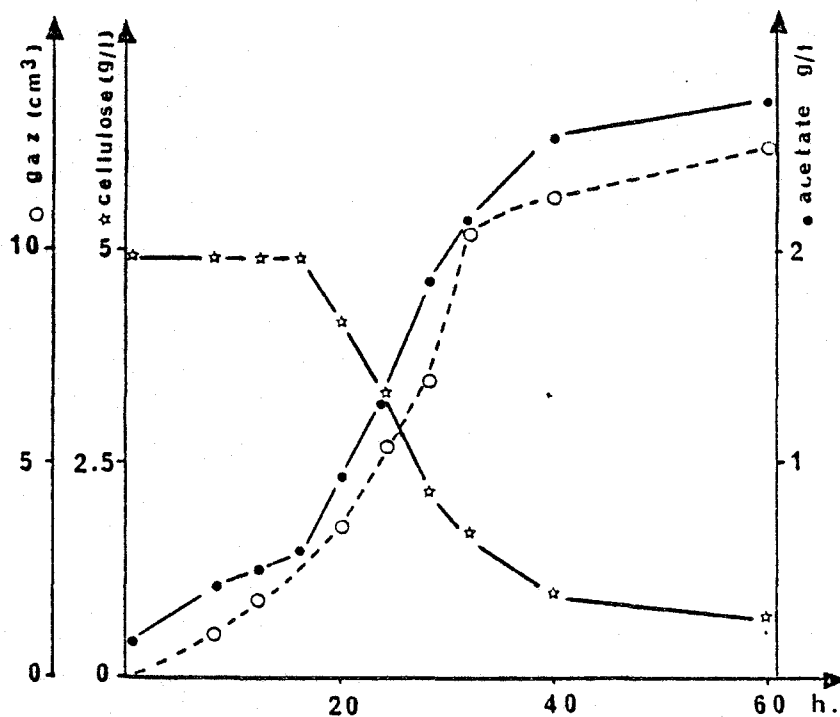


FIGURE n° 18 - CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DE LA CELLULOSE PAR DES POPULATIONS D'ENRICHISSEMENTS THERMOPHIQUES-

Ces cinétiques ont été réalisées après 4 transferts successifs, à une semaine d'interval, en flacons de 100 ml (milieu K1, 5 g/l de cellulose) incubation à 65°C, sans agitation ni régulation du pH (pH initial de 7,4)

N° de l'écosystème	Vitesse d'hydrolyse (Vmax)	Produits terminaux (mM/l)					mMCH <sub>4</sub>	
		Acétate	Propionate	Butyrate	Ethanol	Méthane	mAcétate	
V	236.5	37.3	0.54	0	0	13.3	0.36	
I	350.0	41.3	1.6	0.2	0	16.2	0.39	
II	306.2	36.3	1.6	3.9	0	13.2	0.36	
VI	313.0	43.7	1.2	0.7	0	16.0	0.37	
V	356.4	35.0	0.4	0.2	12.2	12.6	0.35	

TABLEAU n° 15 - HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR DES CULTURES D'ENRICHISSEMENTS DE POPULATIONS THERMOPHIQUES-

V max: en mg d'équivalent anhydroglucose/l/h.

La production d'acétate, en quantité importante (27 et 41 mM) par ces deux cultures d'enrichissements mésophiles, s'accompagne toujours de propionate (jusqu'à 15 mM) et de butyrate (jusqu'à 9,5 mM). Par contre l'éthanol, le lactate et le succinate ne sont pas détectables au cours de ces fermentations.

#### B.- DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR DES CULTURES D'ENRICHISSEMENT THERMOPHILES

Après quatre transferts (5%, v/v) à une semaine d'intervalle, sur milieu K1, nous avons obtenu, à 65°C, une fermentation active de la cellulose et du xylane. La dégradation de 5 g/l de ces deux substrats est complète en 48 heures. Cependant dans tous les cas, la cellulose n'est dégradée qu'après un temps de latence de 8 à 12 heures. En fin de culture, l'acétate, le méthane et le gaz carbonique sont les principaux métabolites formés (figure 18, tableau 15). Les stoechiométries rapportées dans ce tableau (0,35 à 0,40 mole de méthane/mole d'acétate produit) sont voisines de la stoechiométrie théorique de conversion des glucides en acétate et méthane de réduction (0,5 mole de méthane/mole d'acétate). Le déficit en méthane observé s'explique par la synthèse, en faible quantité, de composés plus réduits (éthanol, propionate, butyrate).

Une bonne activité cellulolytique des populations mixtes enrichies a été obtenu entre 50 et 70°C avec un optimum à 60-65°C. A 65°C les vitesses d'hydrolyse de la cellulose, mesurées par la pente de la partie quasi linéaire de la courbe de dégradation, sont comprises entre 300 et 350 mg/l/h (9,7 à 11,3 mmoles d'anhydroglucose/l/h).

N° de l' écosystème	Origine	nombre d' inocula	% des isolats			
			35°C		65°C	
			cellulose	xylane	cellulose	xylane
I	digesteur de lentilles d'eau	4	20	29	31	21
II	digesteur mésophile	1	-	7	-	4
III	digesteur thermophile	1	-	2	6	8
IV	fumier de bovin	1	-	5	31	8
V	boues de mares	7	80	45	25	40
VI	boues sulfureuses	3	-	12	6	17

TABLEAU n° 17 - REPARTITION DES DIFFERENTS ISOLATS EN FONCTION DE L'ORIGINE DES INOCULA -

### III.- ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES HYDROLYTIQUES

Après 7 transferts, une goutte des 17 cultures d'enrichissement sur cellulose, à 35°C et 65°C, a été étalée en boîtes de Pétri sur le milieu K1 gélosé (15 g/l d'Agar, 5 g/l de poudre de papier filtre). De façon analogue, une goutte des 17 enrichissements mésophiles et thermophiles sur xylane (à 5 g/l) a été étalée sur le même milieu gélosé.

65 souches thermophiles et 83 souches mésophiles ont ainsi été isolées. Le rendement d'isolement des souches xylanolytiques est bon aussi bien en mésophilie (86%) qu'en thermophilie (70%). Par contre, nous n'avons isolé que 16 souches cellulolytiques en thermophilie (44%) et 5 en mésophilie (15%) sur le milieu cellulose (tableau 16).

	Milieu xylane		Milieu cellulose	
	35°C	65°C	35°C	65°C
: Nombre total	: 44	: 33	:: 34	: 36
: Cellulolytiques	: 0	: 7/15	:: 5	: 16
: Xylanolytiques	: 42	: 23	:: -	: 12

Tableau 16 : Rendement d'isolement de souches hydrolytiques mésophiles et thermophiles

Le tableau 17 montre la répartition des isolats en fonction de l'origine de l'inoculum. Bien que tous les enrichissements aient permis d'obtenir une dégradation complète du papier filtre à 35°C, nous n'avons pu isolé des bactéries cellulolytiques mésophiles qu'à partir des écosystèmes I (digesteur de lentilles d'eau) et V (boues de mare présentant une dégradation active de la matière organique). Par contre, comparativement au nombre d'inocula des différents écosystèmes, la répartition des isolats xylanolytiques mésophiles est homogène entre les écosystèmes I, II, V et VI.



GROUPE	ORIGINE	MORPHOLOGIE	GRAM (3)	SPORE	PRODUITS DE FERMENTATION (1)		
					acétate	lactate	éthanol
I	I	bacille incurvé	-	+	18	8	20
II	V	bacille épais bacille fin	V -	+	8	15	20
III	V	bacille incurvé	-	+	32-37	4	5-13
							% de fermentation (2)
							89
							60
							43-51

TABLEAU n° 18 - SOUCHES MESOPHILES CELLULOLYTIQUES -

(1) produits exprimés en % du nombre de milli atomes de carbone retrouvés (MAC  $\lambda$  = 187)  
 (2) % de fermentation de la cellulose (5 g/l) exprimé en % de MAC.  
 (3) Gram V: variable.

GROUPE	ORIGINE	NOMBRE	MORPHOLOGIE	GRAM (3)	SPORE	PRODUITS DE LA FERMENTATION (1)						% FERMENTATION (2)
						acétate	éthanol	propionate	butyrate	lactate	succinate	
I	I, V, V	10	bacilles droits	-	8 + 2 -	17-37	12-30	-	-	trace	-	70-100
II	I, VI	3	"	-	+	16-21	-	6-9	-	-	7-11	100
III	VI	2	"	-	+	24-29	13-21	-	-	trace	1,5-2	56-100
IV	II	1	bacille coccoïde	-	+	20	3	5	3	-	10	78
V	V	2	bacilles épais	V	+	17-20	3-4	-	9-10	4-6	-	63-72
VI	I, VI	3	bacilles ovales	V	+	25-35	-	-	4-8	5-6	-	45-50
VII	I	2	bacilles épais	V	+	28-34	-	-	-	3-8	-	34-50
VIII	V	1	bacille fila- menteux	-	+	14	-	-	10	7	3	42

TABLEAU n° 19 - SOUCHES MESOPHILES XYLANOLYTIQUES -

(1) Les produits de fermentation sont exprimés en % du nombre de m AC retrouvés  
 (2) Le pourcentage de fermentation est exprimé en % de nombre de milli atomes de carbone retrouvés (MAC  $\lambda$  initial = 189)  
 (3) Gram V = variable

Le pourcentage de bactéries mésophiles isolées à partir des écosystèmes III et IV est plus faible mais il est intéressant de constater qu'à partir d'un digesteur fonctionnant à 55°C deux souches mésophiles ont pu être isolées. La majorité des isolats thermophiles cellulolytiques proviennent d'un inoculum de fumier de bovin composté (31%) et de quatre inocula de digesteur de lentilles d'eau (31%). La répartition des isolats xylanolytiques thermophiles par contre, compte tenu du nombre d'inocula par écosystème est assez homogène.

#### A.- GROUPAGE DES ISOLATS MESOPHILES

L'ensemble des isolats a été classé en fonction de leurs morphologies et de leurs produits de fermentation. Les tableaux 18 et 19 regroupent les résultats obtenus sur les souches ayant l'activité hydrolytique la plus élevée, en culture à pH non régulé. Une seule souche (groupe 1, tableau 18 annexe) présentait une activité cellulolytique importante (89%). Par contre, nous avons isolé un grand nombre de bactéries capables de fermenter activement le xylane. Le tableau 19 (annexe) ne regroupe que les 24 souches les plus actives.

Ces isolats mésophiles, tous anaérobies stricts, présentent une grande variabilité à la fois par leur morphologie et leurs produits de fermentation. La plupart des isolats sont des bacilles sporulés ne prenant pas la coloration de Gram. Ces bacilles sont de tailles très variables, ils sont droits, incurvés, ovoïdes ou coccoïdes.

Sur cellulose, les produits de fermentation sont limités à l'acétate, lactate, éthanol, H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Par contre, sur xylane un grand nombre d'isolats produisent en plus du propionate, du butyrate et du succinate. Parmi ces isolats, les souches ayant le pourcentage de fermentation le plus élevé proviennent essentiellement des écosystèmes suivants (I) digesteur mésophile; (V) sédiments de rivières et (VI) sédiments de mares sulfureuses.

#### B.- GROUPAGE ET CARACTERISATION DES ISOLATS HYDROLYTIQUES THERMOPHILES

Par comparaison avec C. thermocellum DSM 1237, et en fonction de leurs activités hydrolytiques et de leurs propriétés fermentaires, l'ensemble des isolats thermophiles peuvent se classer en 7 biotypes principaux que l'on peut ranger en 3 grands groupes : le tableau 20

Groupe	I		II				III	
	DSM 1237	TC 11	TC 21	TC 22	TC 23	TC 24	TX 41	TX 31
souches								
N° ecosysteme	I		IV	V	IV	IV	I	II
cellulose	+	+	F	F	F	F	-	-
xylane	-	-	+	+	+	+	+	+
amidon	-	-	+	+	+	+	+	+
cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
glucose	-	-	+	+	+	-	+	+
fructose	-	-	+	-	+	+	+	-
melezitose	-	-	-	-	+	-	+	-
raffinose	-	-	+	+	+	-	+	+
ribose	-	-	+	-	+	+	+	-
mannose	-	-	+	+	+	+	+	+
lactose	-	-	+	+	+	+	+	+
melibiose	-	-	+	+	+	+	+	+
sucrose	-	-	+	+	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
xylose	-	-	+	+	+	+	+	+
rhamnose	-	-	+	+	+	+	+	+

TABLEAU n° 20 - SUBSTRATS FERMENTES PAR LES DIFFERENTS BIOTYPES HYDROLYTIQUES

THERMOPHILES -

concentration initiale en substrat: 2 g/l (sauf pour le xylane et la cellulose:

5 g/l). Les fermentations ont été faites en flacons pénicilline de 10 ml

(milieux K2) et déterminées par la croissance et la baisse du pH ( $> 0,5$ )

(+): positive, (F): faible, (-): négative.

Substrats	Groupe	Souches	CMCase	Xylanase
cellulose	I	TC 11	0,505	1,845
	II	TC 21	0,054	0,427
cellobiose	I	TC 11	0,450	2,147
	II	TC 21	0,216	2,182
xylane	II	TC 21	0,335	2,763
	III	TX 41	0,367	2,182

TABLEAU n° 22 - COMPARAISON DES ACTIVITES CMC-ASIQUE ET XYLANASIQUES  
DES ISOLATS REPRESENTATIFS DES GROUPES THERMOPHILES-

Les dosages ont été faits après 3 jours d'incubation sur cellulose, cellobiose et xylane, en flacons de 10 ml (5 g/l de substrat) à 65°C; Les activités sont exprimées en mg d'équivalent glucose ou xylose, libérés par 1 ml de surnageant pendant 30 mn.

résume les principales caractéristiques et l'origine des souches représentatives de chacun des biotypes. Toutes les souches isolées sont des bacilles droits, de taille variable, anaérobies stricts, ne prenant pas la coloration de Gram, à spore terminale déformante. En culture pure elles ne produisent que de l'acétate, du lactate, de l'éthanol, du gaz carbonique et de l'hydrogène.

Le propionate, le butyrate et le succinate n'ont jamais été détectés dans les milieux fermentés (tableau 20). En pratique, seules les quatre bactéries du groupe I possèdent une forte activité cellulolytique et un taux de croissance élevé sur milieu liquide contenant du papier filtre.

#### B.1.- Groupe I

Les quatre bactéries de ce groupe ont été isolées à partir des biotypes I (3 souches) et II (1 souche). Ce sont des bacilles droits, isolés ou par paires, qui se fixent sur les fibres de cellulose et qui produisent un pigment jaune-orange liposoluble. Dans nos conditions de culture elles ne fermentent que la cellulose et la cellobiose, et de ce point de vue la souche de collection DSM 1237 se comporte de façon identique. Les proportions relatives des trois métabolites présents dans le milieu fermenté (lactate, acétate, éthanol) sont très voisins sur les deux substrats (tableau 21). Ces souches ne fermentent pas les pentoses, cependant elles possèdent une bonne activité xylanolytique. Les activités CMCases et xylanases présentes dans le milieu de culture sont identiques après incubation sur cellulose ou sur cellobiose (tableau 22). Les souches de ce groupe appartiennent donc à l'espèce C. thermocellum.

#### B.2.- Groupe 2

Ce groupe comprend 14 souches dont 12 ont été isolées sur cellulose et 2 sur xylane. Leur morphologie est très voisine de celle de C. thermocellum. Cependant aucune d'entre elles ne produit de pigment. Leur activité cellulolytique est très faible : elles ne dégradent que 250 à 500 mg/l de papier filtre en 7 jours. Par contre elles fermentent une grande variété de polysaccharides (xylane, amidon) et de sucres simples (tableau 20). En fonction des sucres fermentés, nous avons pu les regrouper en 4 biotypes dont les souches représentatives TC 21, 22, 23, 24 ont été isolées respectivement des biotypes IV, V, IV, IV. La distinction entre ces 4 biotypes repose sur

souches	A : CELLULOSE						B : XYLANE						C : CELLOBIOSE				
	PRODUITS (mM)	acetate	lactate	ethanol	CO2	sucres red.	% degra.	acet.	lact.	etha.	CO2	sucres red.	% deg.	acet.	lact.	etha.	CO2
DSM 1237	6.2	5.0	3.9	10.1	14.4	71.1	PAS DE FERMENTATION						6.2	4.2	9.6	15.8	34.2
TC 11	5.0	5.6	6.7	11.7	13.6	72.2	PAS DE FERMENTATION						3.8	6.1	6.6	10.4	28.2
TC 12	6.7	7.5	8.9	15.6	12.7	78.6	PAS DE FERMENTATION						4.5	5.2	5.4	9.9	25.8
TC 21	1.2	2.0	4.3	5.5	0	12.2	4.9	13.8	5.3	10.2	0	38.0	5.2	38.0	9.5	14.3	89.4
TC 22	1.1	2.6	3.2	4.3	0	11.2	6.4	10.6	9.9	16.3	0	42.6	4.8	26.5	8.5	13.3	63.1
TC 23	1.7	1.1	3.5	5.2	0	10.2	6.1	14.7	6.6	12.7	0	43.4	5.8	17.1	8.5	14.3	53.7
TX 31	PAS DE FERMENTATION						8.7	13.3	10.6	18.3	0	51.6	4.4	8.6	4.6	9.0	30.2
TX 41	PAS DE FERMENTATION						4.7	8.1	4.3	9.0	0	27.0	3.2	6.7	3.9	7.1	23.6
TX 42	PAS DE FERMENTATION						5.3	11.7	6.0	11.3	0	36.4	2.7	5.5	2.8	5.5	18.8

TABLEAU n° 21 - PRODUITS DE FERMENTATION DE LA CELLULOSE, DU XYLANE ET DU CELLOBIOSE PAR LES SOUCHES REPRESENTATIVES

DES TROIS GROUPES HYDROLYTIQUES THERMOPHILES -

Les fermentations ont été réalisées en flacons de 10 ml (milieux K2, 5 g/l de substrat) sans agitation ni régulation du pH (pH initial de 7,4). incubation à 65°C, pendant 7 jours.

la fermentation du glucose, du fructose, du raffinose et du ribose. En culture sur cellobiose les productions de CMCase et de xylanase sont très voisines de celles de C. thermocellum. Par contre, sur cellulose la production de ces enzymes est beaucoup plus faible par suite de la croissance très limitée des souches (moins de 10% de cellulose dégradée en 7 jours). Les proportions relatives des métabolites varient en fonction du substrat dégradé : le pourcentage de lactate est élevé lorsque le substrat est facilement fermentescible (tableau 21).

### B.3.- Groupe 3

Les 21 souches isolées ne possèdent aucune activité cellulolytique. Elles fermentent très rapidement le xylane et l'amidon par contre le cellobiose est fermenté lentement (tableau 21). Aucune de ces souches ne produit de pigment. Deux espèces principales (TX 31 et TX 41) peuvent être distinguées en fonction de l'utilisation du fructose, du ribose et du mélézitose (tableau 20).

## DISCUSSION - CONCLUSIONS

La population hydrolytique dans les écosystèmes méthanogènes est très variable et dépend du substrat.

Les dénombrements effectués sur des digesteurs mésophiles et thermophiles ont mis en évidence la présence de bactéries cellulolytiques, amylolytiques et xylanolytiques en nombres importants, comparables à ceux observés sur glucose ( $10^9$  bactéries par ml). Bien que l'utilisation du glucose comme substrat soluble ne nous permette pas d'estimer réellement la flore totale dans ces digesteurs, les résultats obtenus indiquent que la flore hydrolytique dans ces digesteurs est nettement supérieure à celle d'autres écosystèmes bien adaptés.

Dans le rumen, la flore totale est de  $10^{10}$  bactéries par ml, mais les bactéries cellulolytiques ne sont présentes qu'à  $10^7-10^8$  par ml (HUNGATE, 1966). HOBSON et SHAW (1974) ont dénombré dans un digesteur de lisier de porc jusqu'à  $10^4$  bactéries cellulolytiques, amylolytiques et xylanolytiques par ml. Dans un digesteur mésophile, IANNOTI et al. (1982) ont mis en évidence que la population hydrolytique ne représente que 0,1% de la population totale, aérobie et anaérobie.

L'adaptation des populations bactériennes en fonction du substrat est rapide et a été largement étudiée dans le rumen en raison des problèmes d'acidose induits par les changements brusques d'alimentation avec des substrats rapidement fermentescibles tel l'amidon (KAUFMANN et al., 1979 ; CHENG et al., 1977 ; HOBSON, 1972 ; KITSNER, 1965). Récemment ARCHIPRETRE (résultat non publié) a obtenu à partir d'un digesteur caractérisé par une population hémicellulolytique dominante, l'adaptation des bactéries cellulolytiques en moins de 15 jours. Celles-ci passent en effet de  $10^5$  bactéries par ml à  $10^9$  bactéries par ml lorsque le digesteur est alimenté avec un substrat riche en cellulose.

Dans nos cultures d'enrichissement, la dégradation des polymères végétaux par des populations mixtes mésophiles se traduit essentiellement par une production d'acétate, de butyrate et de propionate. Le lactate, le succinate, le formate et l'éthanol ne s'accumulent jamais de façon significative. L'équilibre qui s'établit entre les différentes populations participant à la dégradation de la

cellulose est alors rapide (dès le 2ème transfert) et comparable à celui du rumen (WOLIN, 1975). En effet, le lactate, l'éthanol et le succinate sont produits par un grand nombre des isolats cellulolytiques et xylanolytiques, mais ces intermédiaires sont métabolisés en acétate et propionate dans le rumen (WOLIN, 1975 ; MACKIE et GILCHRIST, 1979). Dans les digesteurs mésophiles traitant des glucides simples SAMAIN (1982), UEKI et al. (1980) ont dénombré jusqu'à  $10^8$  bactéries par ml qui participent à la dégradation du lactate dans des digesteurs. Ces auteurs ont identifié ces bactéries comme étant des sulfato-réductrices, des Propionibacteriacées et des Eubacterium.

Si l'équilibre entre les populations fermentatives s'établit rapidement dès le 2ème transfert, la population méthanigène dégradatrice d'acétate est éliminée progressivement. La dégradation de la cellulose, en mésophilie, par des boues de digesteurs intactes permet en effet un rendement en méthane proche du rendement théorique de 3 moles de  $CH_4$ /mole d'équivalent glucose fermentée (SHARER et MOO-YOUNG, 1979 ; WINTER et COONEY, 1980). Par contre, dans le cas d'enrichissement de la flore hydrolytique par transferts successifs à 7 jours d'intervalle, les résultats que nous avons obtenus avec l'enrichissement II indiquent que la population méthanogène acétoclaste présente dans les digesteurs disparaît progressivement par dilution. Ces résultats confirment ceux de URIBELLAREA et PAREILLEUX (1981) et de KHAN (1980 a). Au cours d'enrichissement, la formation de méthane se fait préférentiellement à partir de l' $H_2$  et du  $CO_2$  plutôt que de l'acétate (KHAN et MES-HARTREE, 1981), la dégradation de l'acétate n'intervient qu'après un temps de latence de 10 jours (SHARER et MOO-YOUNG, 1979) à 3 semaines (KHAN, 1980 a). En effet, le temps de doublement des bactéries méthanogènes est de quelques heures sur  $H_2/CO_2$  (BALCH et WOLFE, 1976) et permet donc leur maintien dans des cocultures avec les bactéries fermentatives. Par contre, le temps de doublement des méthanogènes acétoclastes est de 37 heures (TOUZEL et ALBAGNAC, 1983) et 9 ou 20 jours (ZEHNDER et al., 1980).

Dans le cas de l'enrichissement VI, nous n'avons pas observé de production de méthane de réduction au cours de la dégradation de la cellulose. Il est surprenant de constater dans ce cas que la production d'acétate soit supérieure et que la vitesse de dégradation de la cellulose soit comparable à celle de l'enrichissement méthanigène. Cela indique d'une part que les transferts interespèces d'hydrogène interviennent peu dans l'orientation de l'activité métabolique de nos



populations, contrairement à ce qui a été observé en thermophilie, d'autre part que l'on a sélectionné des cellulolytiques non inhibées par l'hydrogène.

Les vitesses maximales d'hydrolyse de la cellulose par ces cultures mixtes mésophiles sont faibles (47-54 mg/l/h) par rapport à celles obtenues par des cultures mixtes thermophiles (300 à 350 mg/l/h). Elles sont légèrement supérieures à celles rapportées par SHARER et MOO-YOUNG (1979), qui indiquent des vitesses d'hydrolyse du papier filtre par des cultures mixtes de 200 à 250 mg/l/h à 60°C et de 5,9 à 27 mg/l/h à 25 et 38°C. Toutefois ces résultats sont difficilement comparables car les méthodes de mesure de la vitesse de dégradation varient d'un auteur à l'autre.

Outre les vitesses de dégradation de la cellulose plus rapides en thermophilie (en moyenne 6 fois plus rapides), le spectre fermentaire d'une population thermophile est plus restreint, en particulier ni le propionate, ni le butyrate ne s'accumulent de façon significative, ce qui confirme les résultats obtenus par SHELEF et al. (1980) et VAREL et al. (1977, 1980).

Le faible rendement en méthane obtenu par les fermentations thermophiles confirment d'autre part l'absence de production significative de méthane à partir de l'acétate à 65°C (SUCHARDOVA et al., 1981). Aucune bactérie méthanogène acétoclaste n'a en effet été isolée à ces températures. La souche acétoclaste la plus performante du point de vue température est une souche isolée au laboratoire : Methanosarcina CHTI 55 (TOUZEL et al., 1984). Son temps de doublement est minimum à 55°C et à 65°C cette bactérie ne pousse plus.

Ces enrichissements effectués en thermophilie provenaient en grande partie d'écosystèmes froids et tempérés (10 à 35°C). L'adaptation des populations bactériennes s'est donc faite rapidement, en moins de 7 jours. CHEN (1983), par contre notait un temps moyen d'adaptation de 85 jours pour la population hydrolytique d'un fermenteur quand la température est élevée brusquement de 35°C à 60°C.

Quelle que soit l'origine de l'inoculum, nous avons ainsi isolé des bactéries thermophiles vraies (60 et 70°C). Ces résultats s'accordent à ceux de FARREL et CAMPBELL (1969), de BROCK (1967, 1970) et de LJUMDHALL (1978). Ces auteurs font en effet état de la large distribution des thermophiles dans des écosystèmes à faible température (18 à 20°C). La présence de bactéries thermophiles dans ces biotopes peut être due à la formation de micro-environnement par des

fermentations naturelles (ZEIKUS, 1979), la plupart des bactéries cellulolytiques thermophiles ont en effet été isolées à partir d'un inoculum de fumier de bovin, mais aussi à une activité extrêmement ralentie des bactéries, à faible température, leur permettant de se maintenir dans ces biotopes à taux de renouvellement très lent.

Malgré la très forte activité hydrolytique de tous les enrichissements sur cellulose, nous n'avons isolé que 4 souches thermophiles et une souche mésophile possédant une vitesse de croissance élevée sur papier filtre. Ceci peut s'expliquer en partie par l'utilisation de techniques d'isolement imparfaites. Il est en effet très difficile de disperser de façon homogène, dans un milieu gélosé, un substrat insoluble, même s'il est finement divisé, et d'assurer un contact intime entre les particules de cellulose et les bactéries.

Malgré un milieu de culture enrichi en jus de rumen, A.G.V. ramifié et hémine, à partir de certains inocula, nous n'avons pas réussi à isoler en culture pure de bactéries cellulolytiques. En particulier dans des enrichissements non méthanogènes, provenant de boues de mares sulfureuses marocaines (écosystème VI), nous n'avons pu obtenir que des cultures cellulolytiques très actives, hautement purifiées, probablement limitées à deux ou trois espèces bactériennes en symbiose, sans parvenir à isoler les bactéries constituantes.

L'isolement de telles bactéries cellulolytiques demanderait des techniques de travail moins drastiques que celles que nous avons utilisées au cours de cette étude.

Il est étonnant en effet que 100% des isolats thermophiles et 95% des isolats mésophiles possèdent les caractéristiques du genre Clostridium alors que dans des digesteurs, les Clostrida ne représentent que 16 à 20% de la population anaérobie stricte totale (IANNOTTI et al., 1982), et que dans le rumen très peu de Clostridia participent à la dégradation active des polymères végétaux. Il est probable alors que dans les écosystèmes naturels un grand nombre de bactéries non sporulées hydrolytiques soient présentes, mais les méthodes que nous avons utilisées (enrichissements successifs) se sont traduites en fait par un enrichissement en bactéries sporulées, quel que soit l'inoculum d'origine. En effet, au cours de ces enrichissements le milieu s'acidifie jusqu'à pH 5,0. Ces acidifications

répétitives ont certainement un rôle dans l'élimination des bactéries non sporulées, et se traduisent par la sélection d'une flore acido résistante.

Bien que des différences apparaissent dans l'utilisation des sucres, les souches thermophiles isolées sont homogènes dans l'ensemble (morphologie et produits de fermentation).

Si en thermophilie l'hydrolyse de polymères végétaux est alors le fait d'une population clostridiale restreinte, en mésophilie par contre elle est le fait d'une population extrêmement variée surtout en ce qui concerne l'hydrolyse des xylanes. La variété des produits de métabolisme observés chez les isolats mésophiles explique alors la production simultanée de propionate et butyrate, parallèle à celle de l'acétate au cours de la dégradation de la cellulose par des cultures d'enrichissement. En effet, au cours de cette dégradation interviennent non seulement les bactéries cellulolytiques mais aussi les bactéries fermentatives.

A l'exception des bactéries du groupe I, des thermophiles qui se rattachent à l'espèce C. thermocellum, les autres isolats mésophiles et thermophiles n'ont pu être identifiés.

Malgré l'imperfection des techniques utilisées, qui nous est apparue avec le recul du temps, nous avons pu constituer une banque de souches partiellement caractérisées et conservées à - 80°C dans le lait glycérolé. Par la suite, nous nous sommes essentiellement intéressés à l'étude taxonomique et physiologique de trois nouveaux isolats : les souches MC 4, en collaboration avec M. ZYGMUNT, TC 21 et TX 41 en comparaison avec C. thermocellum TC 11.

2EME PARTIE

TAXONOMIE ET PHYSIOLOGIE DES PRINCIPAUX ISOLATS HYDROLYTIQUES  
MESOPHILES ET THERMOPHILES

-§-§-§-§-

## I.- ETUDE DE LA SOUCHE MESOPHILE CELLULOLYTIQUE : Clostridium sp. MC 4

### A.- COLONIES ET MORPHOLOGIE

La souche MC 4 (groupe I des isolats cellulolytiques mésophiles) a été isolée de l'écosystème I (digesteur de lentilles d'eau), après enrichissement sur papier filtre.

Sur milieu gélosé à la cellulose (poudre Whatman CC 31, 5 g/l), les colonies sont très petites (0,5 mm de diamètre) et se développent en 48 heures sans zone de lyse bien nette. Sur milieu gélosé au cellobiose, les colonies sont plus importantes (1-1,5 mm de diamètre, en 48 heures). Ces colonies sont crèmes, lisses et régulières.

Les cellules végétatives sont généralement incurvées, isolées ou par paires, de 4,5-5,5  $\mu\text{m}$  x 0,75-0,0  $\mu\text{m}$  (Figure 19). Elles apparaissent mobiles durant les premières heures de croissance exponentielle. Les bacilles ne prennent pas la coloration de Gram, et le test de GREGERSEN (1978) donne un résultat positif. Toutefois, bien que la paroi apparaissant en microscopie électronique soit de type multi-feuillet, nous n'observons pas de membrane externe (figure 20) pourtant typique des Gram négatifs. Dans nos conditions de culture, la sporulation se fait de façon aisée sur milieu gélosé ou liquide, les spores sont ovales, déformantes et terminales.

### B.- CROISSANCE ET BESOINS NUTRITIONNELS

La souche MC 4 est anaérobie stricte, elle utilise peu de sources carbonées (tableau 23) mais fermente activement les celluloses et hémicelluloses. Le taux de croissance maximal sur cellobiose est obtenu pour un pH de 6,4 (figure 21), cependant la croissance est possible de pH 6,0 à 6,8 avec une augmentation du temps de latence de 6 heures. L'optimum de température se situe à 30-35°C, la croissance étant possible de 30 à 40°C (figure 22).

SUBSTRATS FERMENTES		
glucose	arabinose	cellulose
cellobiose	mannose	salicine
xylose	xylane	
SUBSTRATS NON FERMENTES		
mannitol	esculine	rhamnose
lactose	melezitose	trehalose
saccharose	raffinose	fructose
maltose	sorbitol	melibiose
amidon	galactose	glycérol

TABLEAU n° 23 - SUBSTRATS FERMENTES PAR LA SOUCHE MC<sub>4</sub>

la fermentation des substrats par la souche MC<sub>4</sub> est déterminée par la croissance bactérienne et la mesure de la chute du pH ( $\Delta D.O. > 0,5$ ).

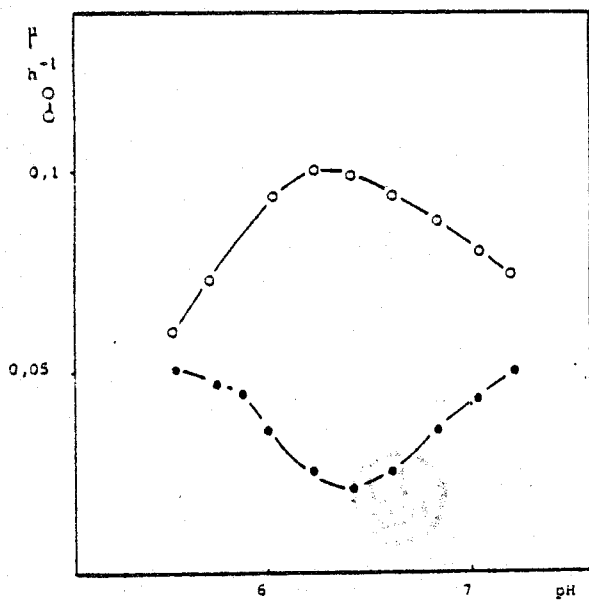


FIGURE n° 21 - INFLUENCE DU pH sur LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MC<sub>4</sub> -

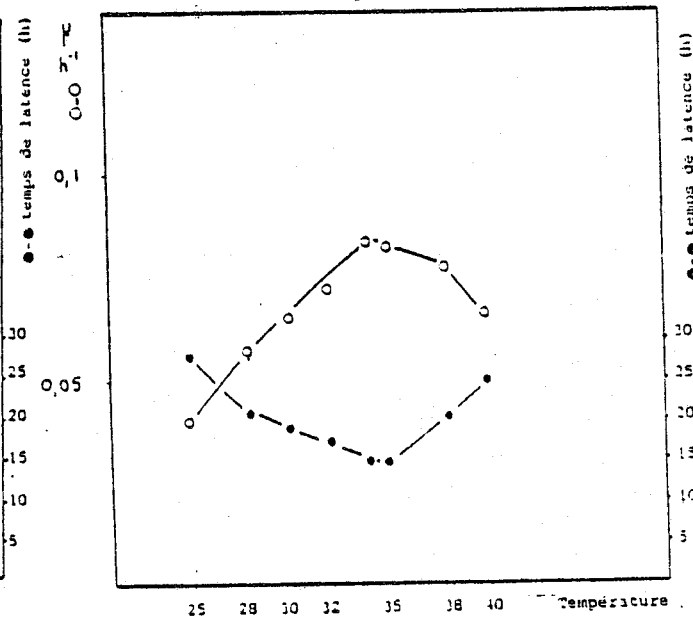
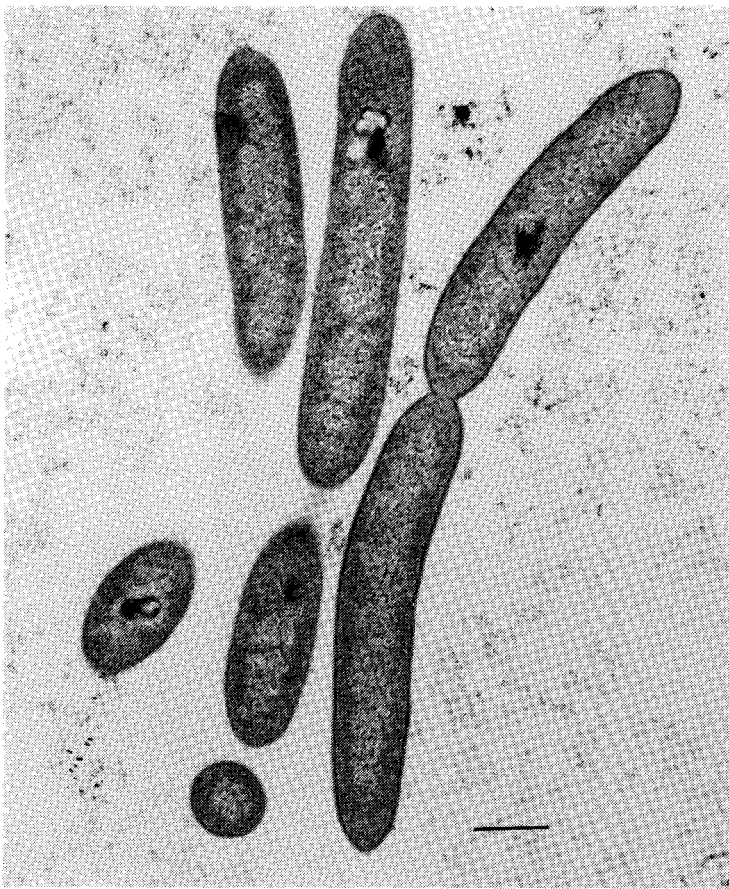


FIGURE n° 22 - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MC<sub>4</sub> -

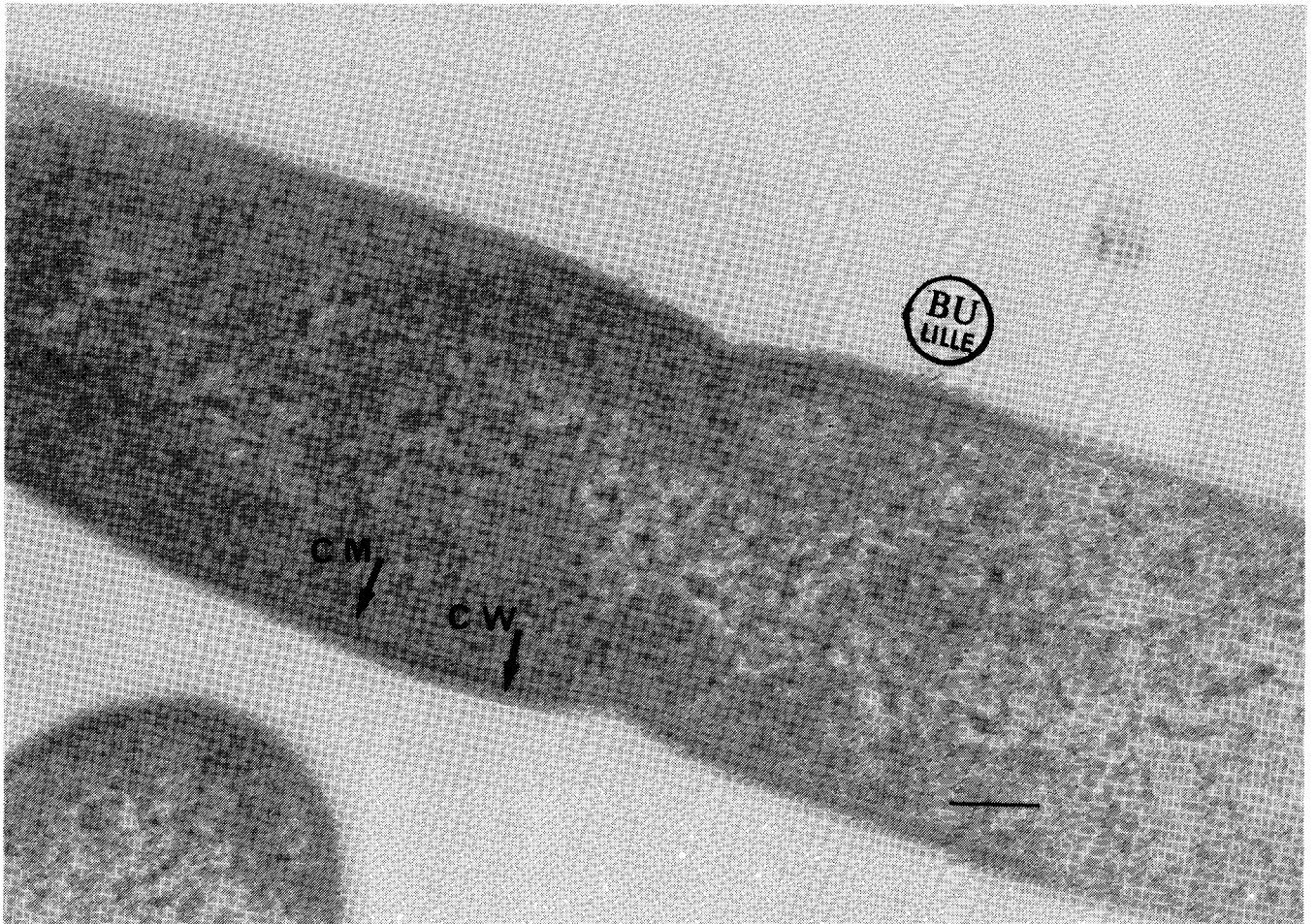
La croissance de la souche MC<sub>4</sub> en fonction du pH et de la température a été suivie en tubes anaérobies de 10 ml, milieu KYEM (0,5 g/l d'extrait de levure).  
 μ<sub>max</sub> : o - o et temps de latence : • - •



-FIGURE n° 19 -

Photographie en microscopie  
electronique de *Clostridium* sp. MC4

(- : 0,5  $\mu$ m)



- FIGURE n° 20 - COUPE ULTRAFINE DE CELLULES VEGETATIVES DE LA SOUCHE  
MC4-

CM: membrane cytoplasmique; CW: paroi; (-) : 0,1  $\mu$ m.

SUBSTRAT	GLUCOSE	CELLOBIOSE	CELLULOSE
substrat consommé (g/l)	8	7	5
acétate (1)	70,0(1,6)	53,3(1,2)	36,7(1,2)
lactate	7,7(0,2)	20,0(0,5)	3,8(0,1)
éthanol	16,1(0,4)	9,8(0,2)	3,5(0,1)
H <sub>2</sub>	139,86(3,2)	106,3(2,5)	73,45(2,4)
CO <sub>2</sub>	85,42(1,9)	63,2(1,5)	40,12(1,3)
sucres réducteurs	-	-	2,2
% de carbone	105	96,2	79,2
O/R index	1,00	1,0	0,99
ATP(môle/mole de sucre fermenté)	3,68	2,95	2,62
V max (2)	270,0	600,0	95,0

TABLEAU n° 24 - BILANS DE FERMENTATION DU GLUCOSE, CELLOBIOSE ET DE LA CELLULOSE

PAR LA SOUCHE MC<sub>4</sub> -

(1) les produits de la fermentation sont exprimés en mM; entre ( ) sont indiqués les rendements en moles/mole de substrat fermentée.

(2) Vmax en mg de substrat /l/h.

les fermentations ont été réalisées en fermenteurs discontinus de 2 l, milieu K2, 10 g/l de substrat initial, pH réglé à 6,4.

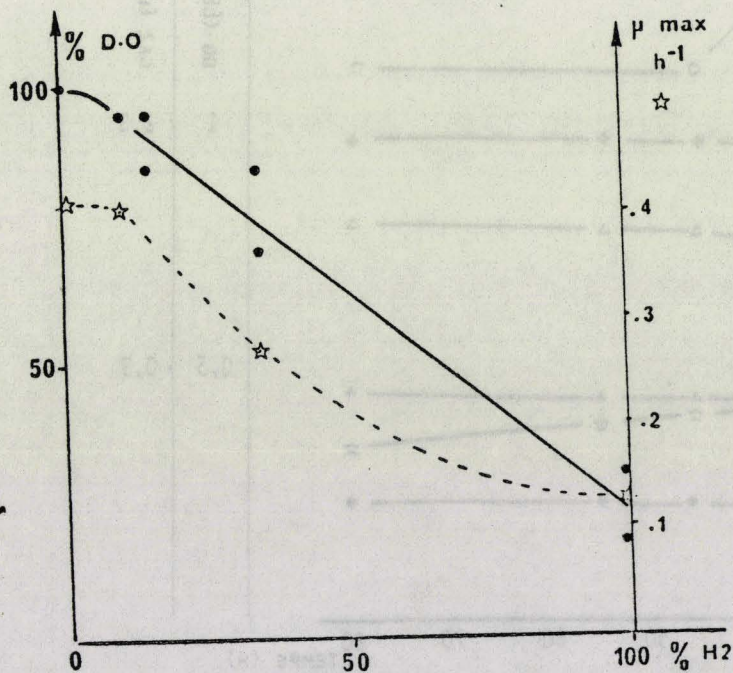


FIGURE n° 25 - INFLUENCE DE LA PRESSION PARTIELLE D'H<sub>2</sub>

SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MC<sub>4</sub> -

La croissance de la souche a été suivie en tubes de 10 ml, milieu KYEM, 0,5 g/l d'extrait de levure et 5 g/l de cellobiose, pH<sub>i</sub> = 6,5; (☆) μ max; (•) % de D.O. par rapport à la croissance optimale avec 0% d'H<sub>2</sub>.



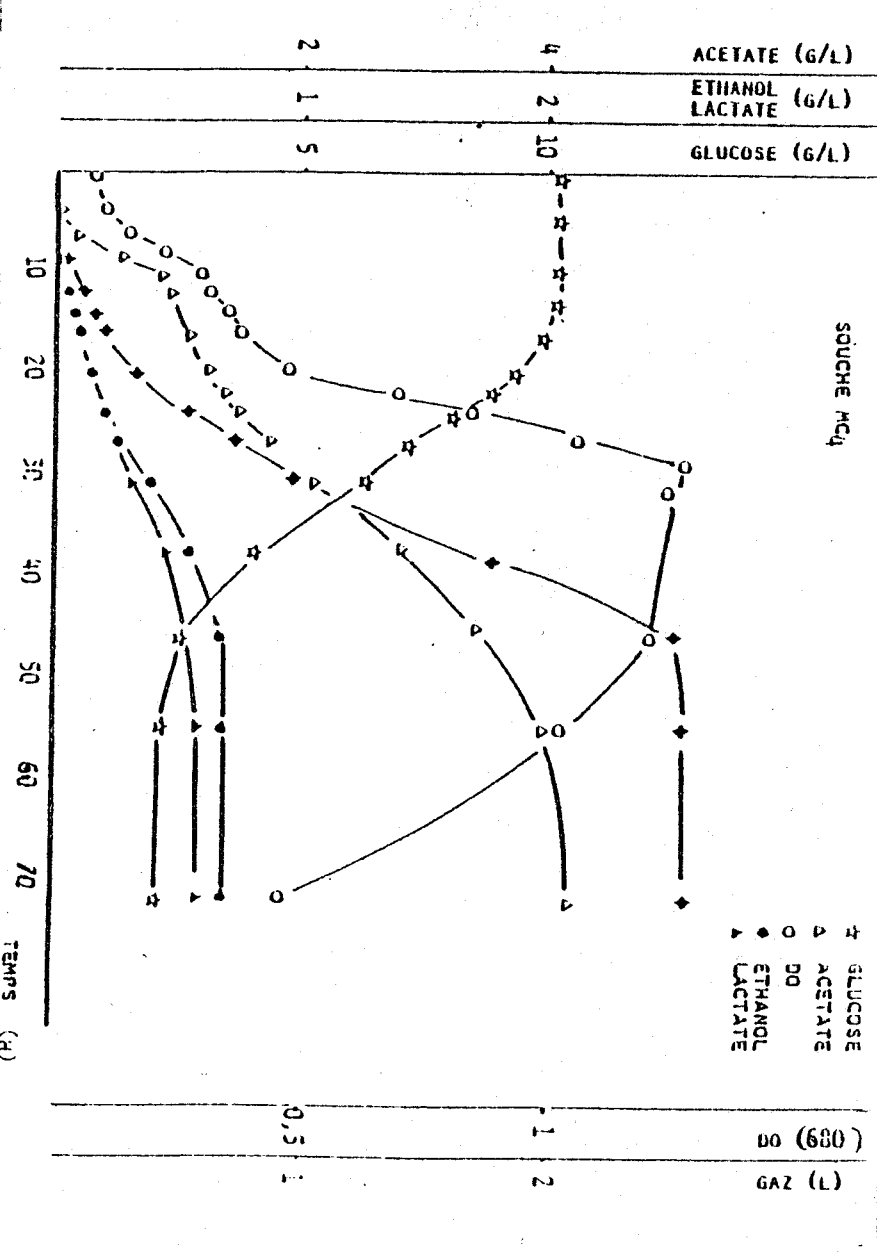


FIGURE n° 23 - CINÉTIQUE DE FERMENTATION DU GLUCOSE PAR LA SOUCHE MC4 -

La fermentation en discontinu du glucose a été suivie en fermenteur de 2 L., milieu K2, 10 g/l de glucose, le pH est régulé à 6,4 par de la soude 5N, et la température maintenue à 35°C.

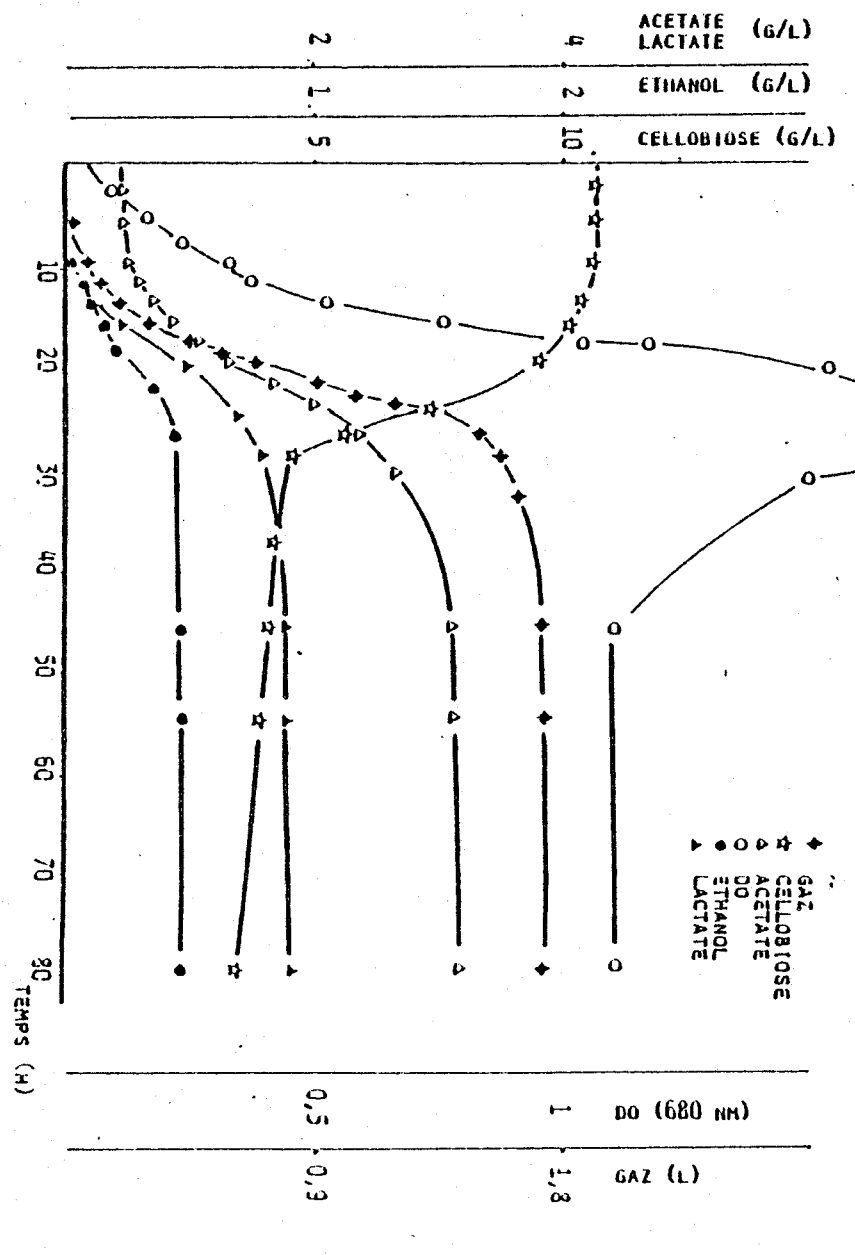


FIGURE n° 24 - CINÉTIQUE DE FERMENTATION DU CELLOBIOSE PAR LA SOUCHE MC4 -

Les conditions de cette fermentation sont les mêmes que celle décrites figure n° 23

Les hydrolysats de caséine servent de sources azotées; en présence ou absence de vitamines l'extrait de levure est indispensable à la croissance et sa concentration optimale est de 2 g/l. A des concentrations supérieures, la croissance de cette souche semble ralentie. Le temps de latence augmente jusqu'à 48 heures avec 5 g/l d'extrait de levure, la croissance reste très faible (D.O. finale divisée par 8 par rapport à l'optimum).

Le chlorure d'ammonium ne peut pas servir de source d'azote même en présence de vitamines. La souche MC 4 ne réduit ni les sulfates, ni les sulfites, ni le thiosulfate en  $H_2S$ . Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites. L'esculine est hydrolysée mais pas la gélatine, ni l'urée.

En conditions optimales, le temps de doublement de la souche MC 4 est de 2,5 heures sur glucose et de 2 heures sur cellobiose. Quel que soit le substrat fermenté, nous avons observé l'excrétion d'un polymère en cours de croissance, augmentant considérablement la viscosité du milieu de culture. En milieu non agité, ce polymère englué les bacilles et la cellulose dans une "gelée" formant ainsi un amas filandreux.

## C.- CINETIQUES ET BILANS DE FERMENTATION

### C.1.- Fermentations du glucose et du cellobiose

Les cinétiques et les bilans de fermentation du glucose et du cellobiose, à pH réglé, sont représentés figures 23 et 24 et tableau 24. Après un court temps de latence, la croissance est rapide sur ces deux substrats ( $\mu_{max} : 0,2 h^{-1}$ ). La souche MC 4 présente cependant une meilleure croissance sur le cellobiose (600 mg/l/h) que sur le glucose (270 mg/l/h). La lyse bactérienne intervient rapidement, après 30 heures de culture sur cellobiose et 40 heures sur glucose, et avant que la totalité du substrat ait été fermentée. L'hydrogène et l'acétate sont les produits majeurs de la fermentation par la souche MC 4. Le rendement en acétate est de 1,23 mole/mole de cellobiose fermenté et de 1,57 mole/mole de glucose fermenté. Sur cellobiose la production de lactate est toutefois supérieure (0,5 mole/mole de cellobiose fermenté) que sur glucose (0,17 mole/mole de glucose fermenté).

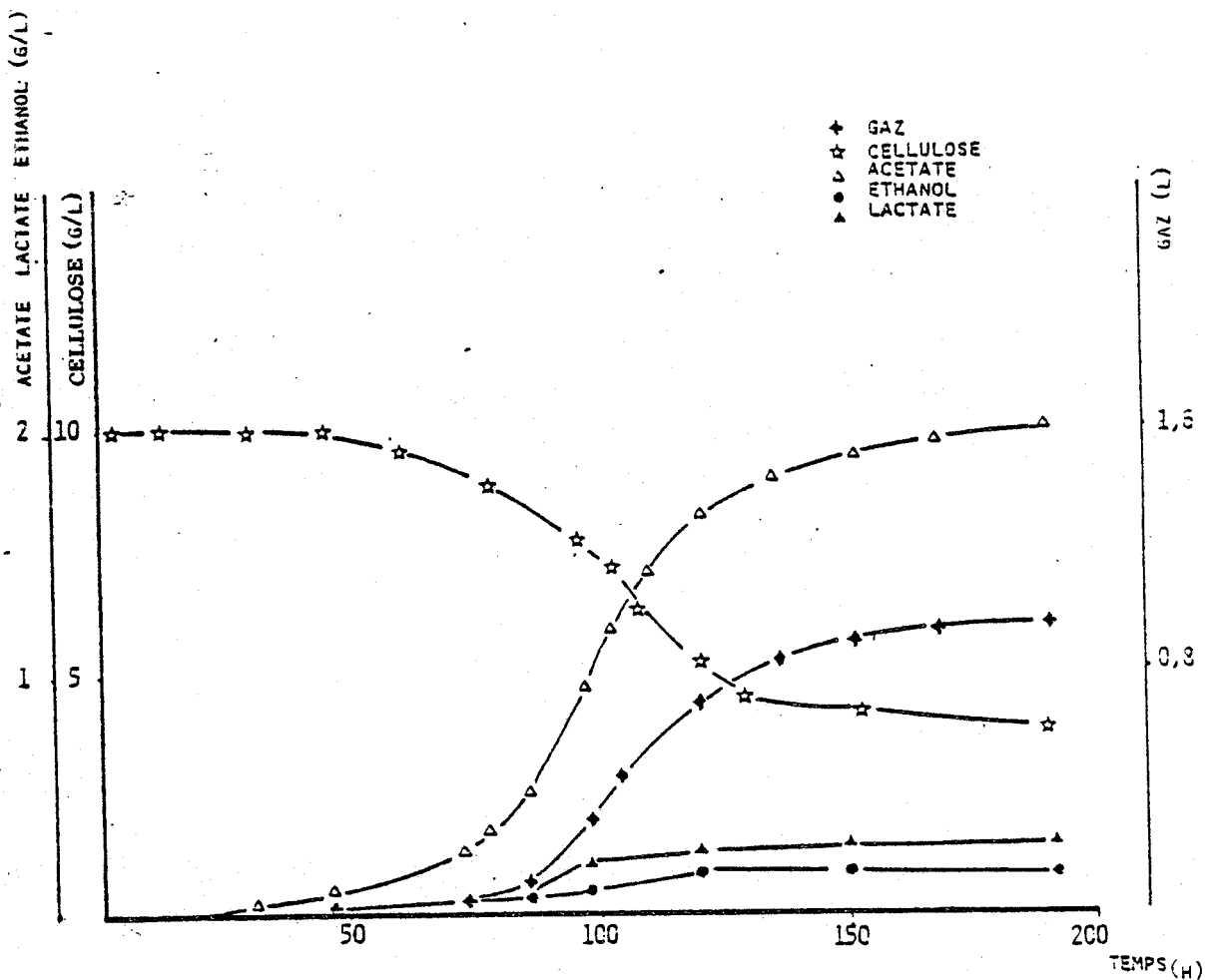


FIGURE n° 26 - CINETIQUE DE DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR LA SOUCHE MC<sub>4</sub> -

La fermentation en discontinue de la cellulose a été réalisée en fermenteur de 2 l., milieu K2 contenant 10 g/l de cellulose, le pH est réglé à 6,4 par de la soude 5N, la température est maintenue à 35°C.

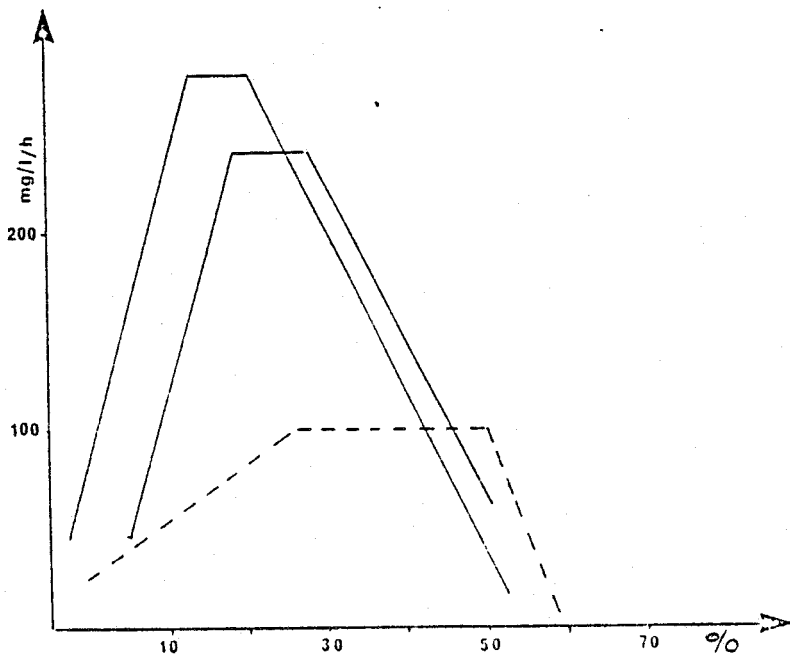


FIGURE n° 27 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR LA SOUCHE MC<sub>4</sub> EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN CELLULOSE

La vitesse de dégradation de la cellulose est exprimée en fonction du % de cellulose dégradé.  
 (- -) avec 10 g/l, (—) avec 40 g/l de cellulose initiale.

### C.2.- Inhibition de la croissance de la souche MC 4 par l'hydrogène

Afin de déterminer les conditions de l'arrêt de la fermentation par la souche MC4, nous avons étudié l'influence de l'hydrogène produit (2,4 à 3,5 moles/mole d'hexose fermentée) sur le métabolisme de cette bactérie.

La croissance de cette souche a été suivie en tubes anaérobies, dans lesquels l'atmosphère (100% d'azote) était remplacée par des concentrations croissantes en hydrogène (10, 30, et 100%). Les résultats obtenus (figure 25) indiquent clairement une inhibition de la croissance de cette bactérie dès que la concentration en hydrogène est supérieure à 10%.

### C.3.- Fermentation de la cellulose

La dégradation de la cellulose est lente ( $V_{max}$ : 95 mg de cellulose/l/h, avec 10 g/l de cellulose initial), et débute après un temps de latence de 30 à 40 heures. Quelque soit la quantité de cellulose initiale (10 et 40 g/l), 60 % seulement de cellulose sont hydrolysés en 150 et 200 h. (figure 26) et les sucres solubles ne s'accumulent qu'en faibles quantités (0,4 g/l). Sur ce substrat, le rendement en acétate est de 1,2 moles par mole d'équivalent anhydroglucose fermentée (tableau 24). Si l'arrêt de la croissance de la bactérie peut s'expliquer au moins en partie par une inhibition due à la pression partielle d' $H_2$  trop élevée en fin de culture, l'arrêt de la cellulolyse, par contre, est dû soit à une inhibition des hydrolases excrétées soit à une limitation en substrat. Si cette souche ne fermentait que les structures facilement dégradables (zones amorphes) sans pouvoir hydrolyser les parties cristallines de la cellulose et sans qu'il y ait inhibition des enzymes, nous aurions dû obtenir, quelle que soit la quantité de cellulose initiale, une cinétique de dégradation identique. La figure 27 représente les vitesses de dégradation de la cellulose en fonction du pourcentage de cellulose hydrolysée. Avec 10 g/l de cellulose initiale, l'hydrolyse de la cellulose est lente et la vitesse maximale de dégradation (95 mg/l/h) reste constante de 25 à 50 % de dégradation. Avec 40 g/l de cellulose initiale, bien que le temps de latence soit identique, la souche MC 4 hydrolyse plus vite la cellulose ( $V_{max}$  = 280 mg/l/h). Par contre, cette

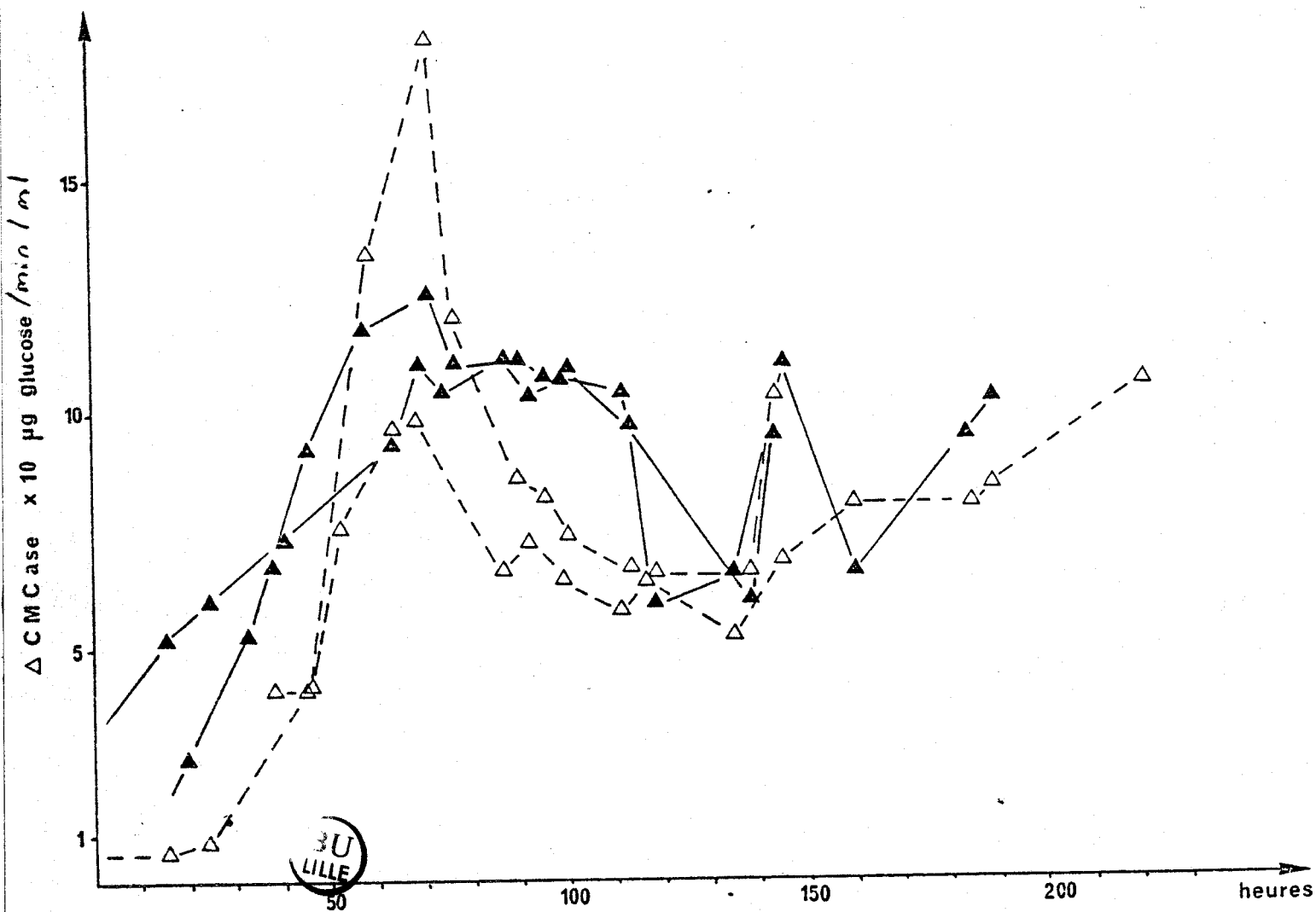


FIGURE n° 28 - CINÉTIQUE D'APPARITION DES ACTIVITÉS CMCASIQUES ET XYLANASIQUES AU COURS DE LA FERMENTATION DE LA CELLULOSE PAR LA SOUCHE MC<sub>4</sub> -

Le dosage des activités enzymatiques extracellulaires de la souche MC<sub>4</sub> a été fait au cours d'une cinétique de dégradation de la cellulose (40 g/l initial) l'activité CMCase est exprimée en μg (x 10) d'équivalent glucose libérés pendant 15 min. L'activité xylanase est exprimée en μg (x 10<sup>2</sup>) d'équivalent xylose libérés pendant 15 min/ml.

vitesse maximale ne reste constante qu'entre 15 et 25 % de dégradation, ce qui confirme indirectement l'inhibition des cellulases excrétées par les produits de dégradation de la cellulose.

La figure 28 montre l'apparition des activités enzymatiques dans le surnageant de culture sur cellulose. L'activité xylanasiq ue apparaît beaucoup plus tôt, et avec une intensité dix fois plus élevée que l'activité CMCasique. L'apparition des activités CMCasiques est couplée à la dégradation de la cellulose. Nous observons un pic d'activité à 80-90 h. de culture, suivi d'une chute des activités enzymatiques. Bien que l'activité CMCasique réapparaisse progressivement dans le surnageant de culture après 150 h, la cellulolyse reste bloquée.

#### D.- DISCUSSION - CONCLUSIONS

Anaérobie stricte, sporulée, catalase négative, ne réduisant pas les sulfates en  $H_2S$ , cette souche doit donc être rattachée au genre Clostridium. Cet isolat se différencie nettement des autres Clostridia décrits dans la littérature : C. cellobioparum (HUNGATE, 1950), C. lochheadii, C. longisporum, C. disolvens (HUNGATE, 1966) et C. papyrosolvens (MADDEN et al., 1982) à la fois sur le plan morphologique que sur le plan des substrats fermentés et des pH optima de croissance. La plupart de ces espèces se développent en effet au voisinage de la neutralité.

Contrairement à la souche MC 4, C. lochheadii, C. longisporum et C. cellobioparum sont des bacilles droits fermentant l'amidon, le fructose et le maltose. D'autre part C. cellobioparum produit en plus du butyrate lorsqu'il est cultivé sur glucose (CHUNG, 1976). Contrairement à C. papyrosolvens, bacille droit, la souche MC 4 ne ferme ni le galactose ni le mannitol, mais fermente activement le xylane et le mannose. D'autre part, C. papyrosolvens croît à pH 7,3 et est capable de se développer à 15°C.

Récemment LECHINE et CANALE-PAROLA (1983) ont décrit un Clostridium cellulolytique proche de la souche MC 4 à la fois du point de vue morphologique, des substrats fermentés et produits de fermentation (essentiellement acétate et  $H_2$ ). Toutefois cette souche hydrolyse lentement la cellulose ( $V_{max} = 59 \text{ mg/l/h}$ ), sans qu'il y ait inhibition des cellulases après arrêt de la fermentation, ce qui se traduit par une accumulation de sucres dans le milieu. D'autre part,

ces auteurs ne mentionnent pas la production de polymères augmentant même temporairement la viscosité du milieu de culture. Par contre, GIALLO et al. (1983) ont étudié une souche cellulolytique Clostridium sp. H10 ayant un comportement similaire à celui de la souche MC 4 : production de polysaccharide extracellulaire, et inhibition de la croissance. La souche MC 4 se distingue toutefois de la souche H10 par un rendement en acétate plus élevé (1,2 à 1,5 moles/mole d'hexose fermentée au lieu de 0,5 à 0,7 mole/mole d'hexose fermentée). La souche H10 produit d'autre part de faibles quantités de succinate et sa croissance n'est pas inhibée par l'hydrogène. Chez cette souche, les auteurs n'ont pas déterminé quelles étaient les causes de l'inhibition de la croissance. Dans le cas de la souche MC 4, il est possible qu'une inhibition supplémentaire soit due à l'accumulation d'acétate dans le milieu de culture, toutefois cette hypothèse demanderait à être confirmée.

La nature du polymère synthétisé par la souche MC 4 n'a pu encore être déterminée. La production de polymères de réserve ou de polysaccharides extracellulaires a été bien étudiée chez les bactéries aérobies (DAWES et SENIOR, 1973; PACE, 1980; HESTRIN et SCHRANN, 1954). Parmi les bactéries anaérobies strictes, la synthèse de polysaccharides de réserve est très peu étudiée. Ruminococcus albus (HUNGATE, 1963), Selenomonas ruminantium (CHENG et al., 1973) et Acetivibrio cellulolyticus (PATEL et BREUIL, 1981) ont été décrits comme accumulant un polysaccharide de réserve de type glucane ramifié glycogène ou amylo-pectine. Cette accumulation se fait en limitation d'azote (WALLACE, 1980 ; PATEL et BREUIL, 1981), à pH acide (CATTLEY, 1971) ou en présence de CO<sub>2</sub> chez Streptococcus bovis (DAIN et al., 1956).

L'inhibition de la cellulolyse chez Clostridium sp. MC 4 peut être due à l'accumulation de sucres dans le milieu de culture, et bien que cette accumulation soit faible dans nos conditions de culture. En effet, si nous ajoutons au moment du dosage enzymatique une quantité de glucose équivalente (0,4 g/l), nous obtenons une chute de 40% de l'activité CMCasique et de 30% de l'activité xylanasique. Cette inhibition des cellulases par le glucose n'est pas suffisante pour expliquer l'arrêt de l'hydrolyse et il est possible alors que l'accumulation de l'acétate ait un rôle inhibiteur comme c'est le cas chez A. cellulolyticus (KHAN, 1980 a). Chez cette espèce bactérienne, l'inhibition de la cellulolyse est levée par la coculture avec Methanosarcina barkeri, méthanogène à partir de l'acétate. De même,

certaines bactéries mésophiles comme Cellulomonas sp. voient leur activité cellulasique inhibée par le lactate (CHOSSON, résultat non publié). Ces hypothèses demanderaient donc à être confirmées par une étude plus fine des systèmes enzymatiques impliqués dans l'hydrolyse des polymères végétaux. Toutefois, lors de la coculture de la souche MC4 avec Clostridium acetobutylicum, utilisant à la fois les sucres et l'acétate produits, la cellulolyse reprenait (ZYGUMT, 1983).

Des études seraient donc indispensables de façon à compléter la caractérisation de cet isolat, d'une part d'un point de vue taxonomique, et d'autre part en étudiant la composition biochimique du polymère excrété, ainsi que la nature des hydrolases produites par cette bactérie.



SOUCHES	MORPHOLOGIE	PIGMENTATION	CROISSANCE	RAPPORT ETHANOL/ACETATE
TC 11	bacilles droits, isolés ou par paire	+	rapide	2,2
TC 12	"	+	rapide	1,6
AT 1	bacilles courts	+	lente	1,6
S 13	petits bacilles en chaines	-	lente	1,8
AT SPIL	"	-	lente	1,6
A 22	petit bacilles isolés	+	rapide	NF
N 213 22	bacilles épais en chaines	-	rapide	2,8

TABLEAU n° 25 - DIFFERENTIATION DES ISOLATS DE C. THERMOCELLUM -

NF: pas déterminé.

SOUCHES	Δ D.O.	GLUCOSE	GLUCOSE + E.L.	FRUCTOSE	FRUCTOSE + E.L.	MANNITOL	MANNITOL + E.L.
	TC 11	-	-	0,280	-	-	-
TC 12	-	-	-	-	-	-	-
N 213 22	1,03	1,03	0,80	0,33	0,40	-	-
AT 1	-	-	-	-	-	-	-
AT SPIL	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU n° 26 - ADAPTATION DES SOUCHES DE C. THERMOCELLUM SUR GLUCOSE,

FRUCTOSE ET MANNITOL, EN ABSENCE OU PRESENCE (+ E.L.) D'EXTRAIT DE LEVURE

(5 g/l)

La croissance est suivie en tubes anaérobies, milieu K2, pH de 7,4, incubation à 60°C pendant 4 semaines.

## II.- ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE C. THERMOCELLUM SOUCHE TC 11 (GROUPE I DES THERMOPHILES)

Parmi tous les isolats de C. thermocellum, nous avons opté pour l'étude de la souche TC 11. Celle-ci présentait en effet le rapport éthanol/acétate le plus élevé et une vitesse de dégradation de la cellulose nettement supérieure à celle de la souche de référence C. thermocellum DSM 1237.

En cours d'année, nous avons été amenés à isoler d'autres souches de C. thermocellum à partir de cultures contaminées de C. thermocellum ATCC 27405. L'ensemble des isolats présente les caractéristiques propres à C. thermocellum, toutefois de nombreuses variations, que nous préciserons, existent au sein de cette espèce bactérienne.

### A.- COLONIES ET MORPHOLOGIE

Sur milieu gélosé à la cellulose (poudre Whatman CC 31), la souche TC 11 forme des colonies inférieures à 1 mm de diamètre, en 48 h., et entourées d'un halo clair de lyse. Sur milieu gélosé au cellobiose, les colonies sont plus grosses (2 mm de diamètre en 48 h.). Ces colonies sont jaunes, régulières et lisses.

Les cellules végétatives sont des bacilles droits de tailles variables ( $4-9 \mu\text{m} \times 0,5-0,7 \mu\text{m}$ ), généralement isolés ou par paires, ne prenant pas la coloration de Gram.

La sporulation s'obtient facilement sur milieux gélosés ou liquides, les spores sont rondes ou légèrement ovales (figure 29).

Les cellules végétatives et les cellules sporulées s'attachent fermement aux fibres de cellulose (figure 29). Cet attachement se fait par l'extrémité opposée à la spore et la figure 31 montre à cette extrémité un pédoncule dont le rôle et la nature n'ont pu être déterminés.

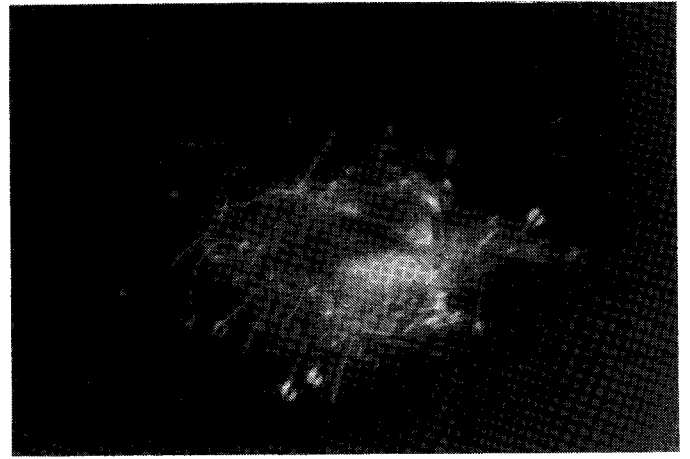
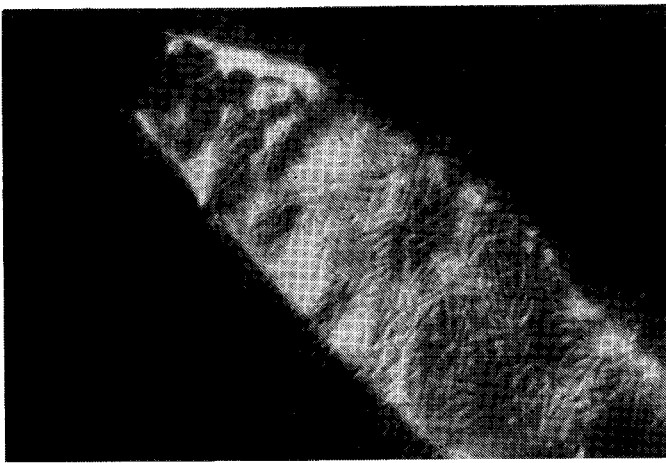
Dans des conditions de culture identiques, des différences morphologiques interviennent parmi les souches de C. thermocellum (figure 30 a, b, c). Le tableau 25 regroupe d'autre part les principales variations observées au sein de cette espèce bactérienne.

FIGURE n° 29 a et b - PHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE A CONTRASTE INTERFERENCIEL DE CELLULES VEGETATIVES ( 29 a) ET SPORULEES (29 b) DE C. THERMOCELLUM SOUCHE TC 11 - Les bacilles de *C. thermocellum* sont fermement fixés sur les fibres de cellulose, l'attachement se fait par l'extrémité opposée à la spore ( 29 b).

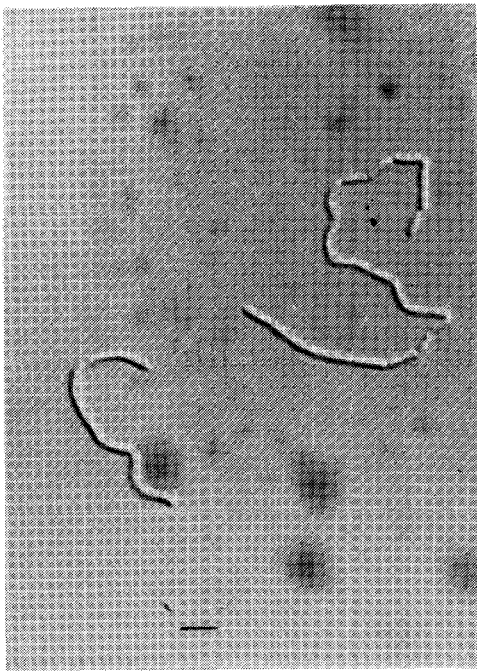
FIGURE n° 30 - PHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE A CONTRASTE DE PHASE DE DIFFERENTES SOUCHES DE C. THERMOCELLUM -  
figure 30 a: souche AT SPIL; figure 30 b: souche N 213 22; figure 30 c: souche 22  
la barre est équivalente à 5  $\mu$ m.

FIGURE n° 31 - PHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE A CONTRASTE DE PHASE DE CELLULES SPORULEES DE LA SOUCHE TC 11 -  
La barre est équivalente à 1  $\mu$ m. Noter à l'extrémité du bacille la présence d'un renflement.

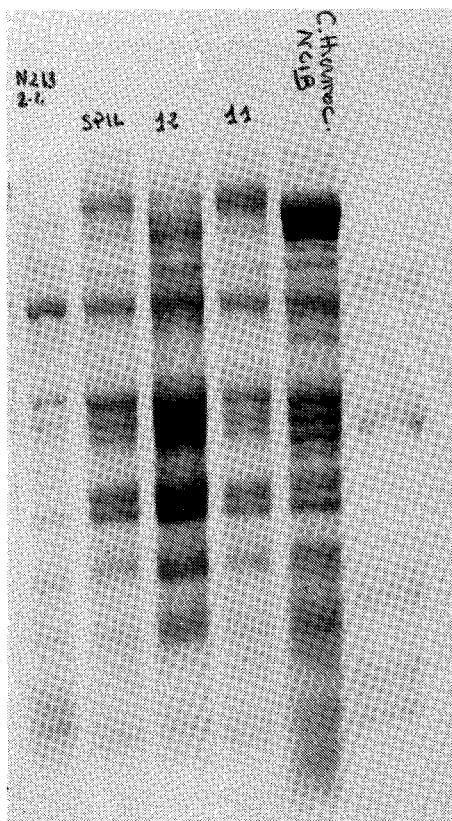
FIGURE n° 32 - PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DE DIFFERENTES SOUCHES DE C. THERMOCELLUM -  
de gauche à droite les souches N 213 22, AT SPIL, TC 12, TC 11 et NCIB 10682;



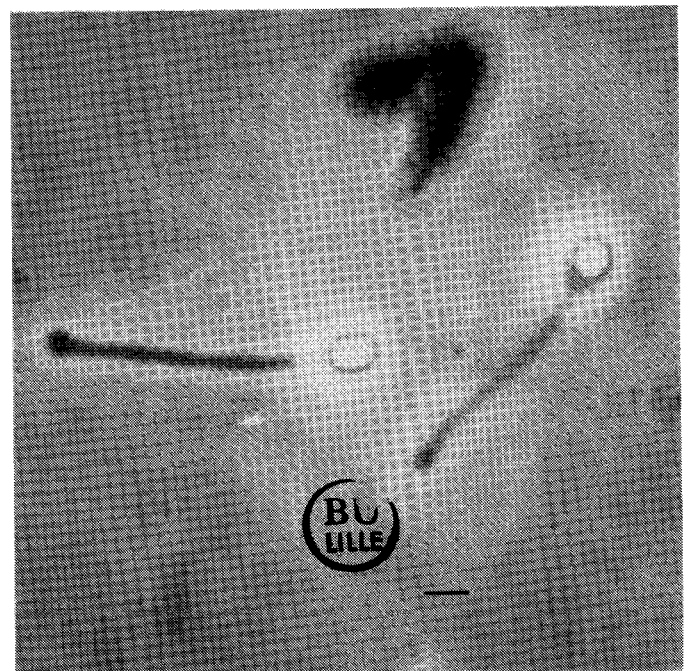
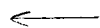
- FIGURE n° 29-



- FIGURE n° 30-



- FIGURE n° 32-



- FIGURE n° 31-



Les souches A 22, N 213 22, AT SPIL, et AT 1, ont été isolées de cultures contaminées de C. thermocellum ATCC 27405. Outre les variations morphologiques, certaines souches de C. thermocellum ne produisent pas le pigment jaune-orangé, pourtant caractéristique de cette espèce bactérienne, ni en milieux liquides, ni en milieux gélosés.

#### B.- CONDITIONS DE CROISSANCE

La souche TC 11 de même que les autres souches de C. thermocellum possèdent une température et un pH optima de croissance respectivement de 65°C et 7,2-7,4. Ces souches ne fermentent activement que la cellulose et le cellobiose. En conditions optimales de croissance, la souche TC 11 a un temps de doublement de 1,2 h. sur cellobiose.

La croissance de différents isolats de C. thermocellum a été suivie sur glucose, fructose et mannitol, en absence ou présence de fortes concentrations d'extrait de levure (5 g/l). A 65°C, aucune croissance n'a été observée après un mois d'incubation. A 60°C, une seule souche, la souche N 213 22 s'est bien développée sur glucose, en présence ou absence d'extrait, en une semaine (tableau 26). Sur fructose la croissance de cet isolat est restée faible et très lente ( $\Delta$ D.O. = 0,3-0,4 en quatre semaines). Parmi tous les autres isolats seule la souche TC 11 a semblé s'adapter lentement sur glucose en présence d'extrait de levure ( $\Delta$ D.O. = 0,280 en quatre semaines). Sur mannitol, nous n'avons jamais observé de croissance des souches, même en présence d'extrait de levure, et après quatre semaines d'incubation.

#### C.- COMPARAISON DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES DES DIFFERENTES SOUCHES DE C. THERMOCELLUM

L'étude des protéines des différentes souches de C. thermocellum a été faite selon la méthode mise au point par MAGOT et al. (1983).

PRODUITS DE LA FERMENTATION	7,2 (1)	7,4 (1)	7,4 (2)
cellulose initiale (g/l)	5	10	10
acétate (3)	7,8 (50,5)	16,0 (57,1)	28,0 (62,9)
éthanol	11,1 (71,8)	20,0 (71,4)	46,0 (103,4)
lactate	12,0 (77,6)	20,0 (71,4)	15,0 (33,7)
formate	-	3,9	6,74
H <sub>2</sub>	15,6 (100,9)	28,4 (101,4)	49,3 (110,6)
CO <sub>2</sub>	18,9 (122,2)	32,0 (114,2)	67,3 (151,0)
sucres réducteurs	13,0	25,9	0
bilan carbone (%)	92,2	87,4	72,2
O/R index	0,99	0,95	0,97
V max (mg/l/h)	54,0	108,0	470,0

TABLEAU n° 27 - BILAN DE FERMENTATION DE LA CELLULOSE PAR C. THERMOCELLUM

SOUCHE TC 11 -

(1) les fermentations à pH non régulé sont réalisées en flacons de 300 ml, milieu K2, pH de 7,2 et 7,4, incubation à 65°C pendant 7 jours.

(2) à pH régulé, les fermentations sont faites en fermenteurs de 2 litres, milieu K2, à 65°C, la régulation du pH est faite par de la soude 5N, la durée des fermentations est de 72 h.

(3) les produits de fermentations sont exprimés en mM; entre ( ) le rendement est exprimé en mmoles/100mmoles d'équivalent anhydroglucose fermentées.

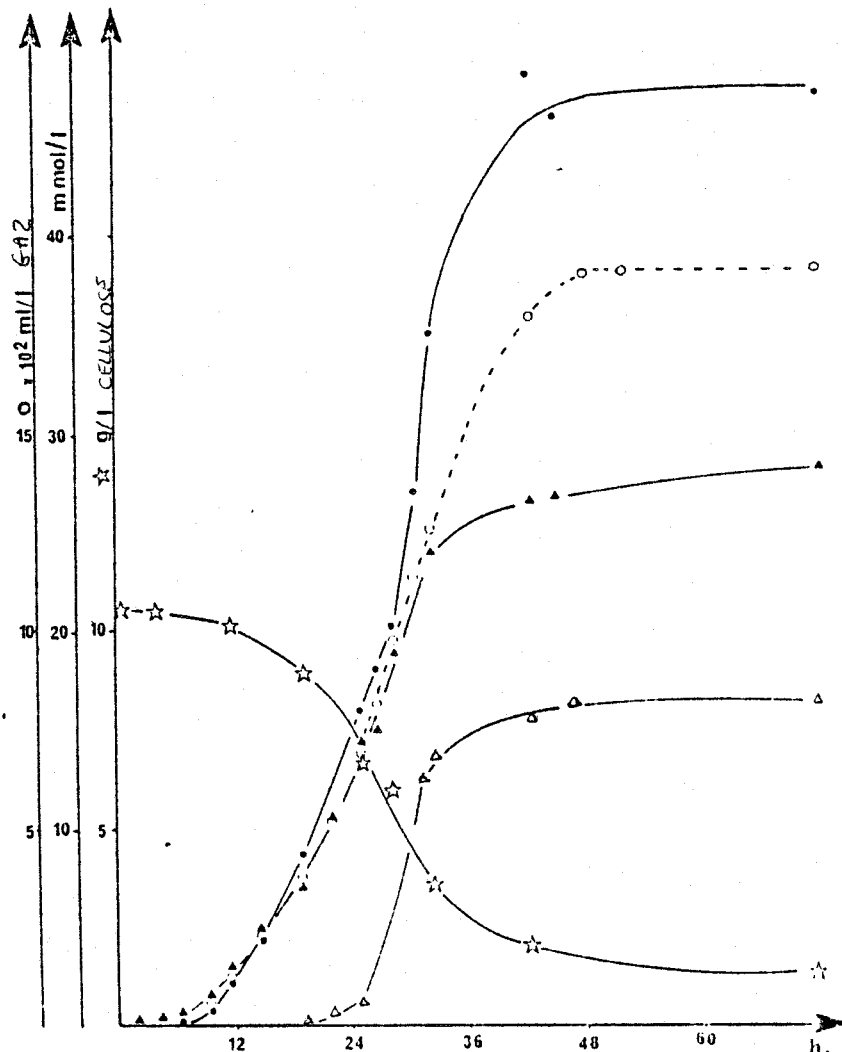


FIGURE n° 33 - CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DE LA CELLULOSE PAR C. THERMOCELLUM  
SOUCHE TC 11 -

La fermentation en discontinu a été suivie en fermenteur de 2 l., milieu K2, 10 g/l de cellulose, le pH est régulé à 7,4 par de la soude 5N, la température est maintenue à 65°C. Les résultats sont exprimés en mM (▲) acétate, (●) éthanol, (△) lactate; en g/l (☆) cellulose et en ml/l de gaz produit (○).

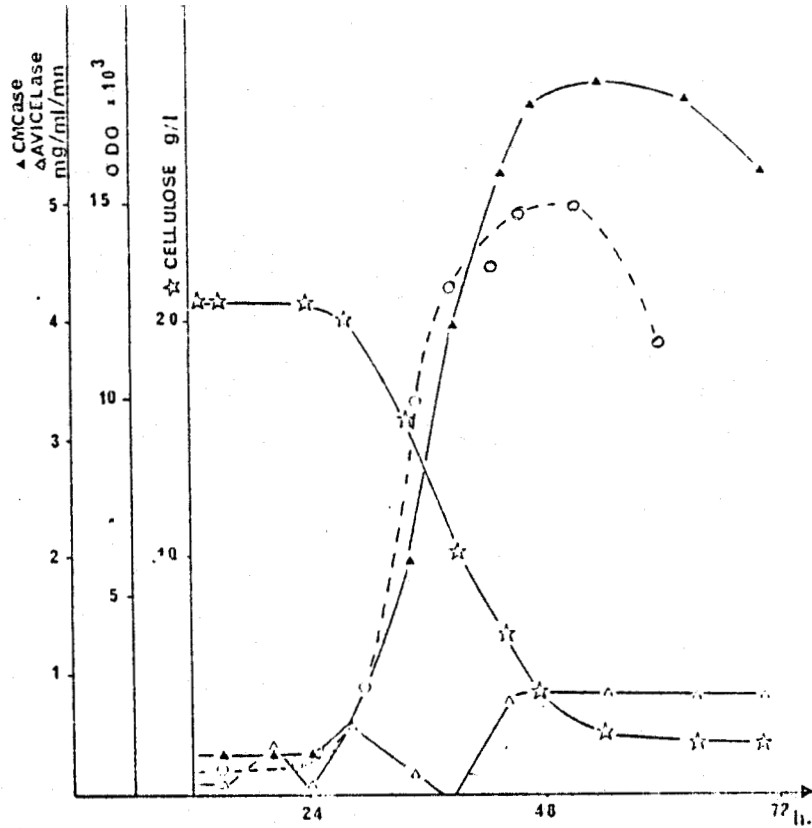
Les souches TC 11 et TC 12, isolées de digesteurs, et les souches N 213 22 et AT SPIL, isolées de cultures contaminées de C. thermocellum ATCC 27405, ont été comparées à une souche de référence C. thermocellum NCIB 10682, fournie par Mme MILLET (Institut Pasteur, PARIS).

Bien que la définition dans les bandes protéiques par cette méthode ne soit pas très satisfaisante, nous pouvons constater une homogénéité parmi les différents isolats de C. thermocellum. Des différences apparaissent surtout au niveau de l'intensité de certaines protéines (figure 32). Par la suite, nous avons utilisé la méthode d'électrophorèse décrite dans la partie Matériels et Méthodes.

#### D.- PRODUITS ET BILANS DE FERMENTATION DE C. THERMOCELLUM TC 11

D.1.- En culture discontinue et à pH non régulé, la fermentation de la cellulose par la souche TC 11 cesse en 72 h., en raison de l'acidification du milieu. Le tampon utilisé ( $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ) étant faible, le pH chute rapidement à 5,8-5,9, inhibant la croissance bactérienne. Par contre à ces pH acides, la cellulolyse se poursuit et se traduit par une accumulation de sucres réducteurs dans le milieu de culture. Les sucres s'accumulent dès que le pH est inférieur à 7,0: 42% de la cellulose initiale se retrouvent ainsi hydrolysés sous forme de glucose et de cellobiose, après arrêt de la fermentation (tableau 27). Ceci confirme indirectement que les cellulases de C. thermocellum ne sont pas inhibées par les sucres contrairement à la souche mésophile MC4.

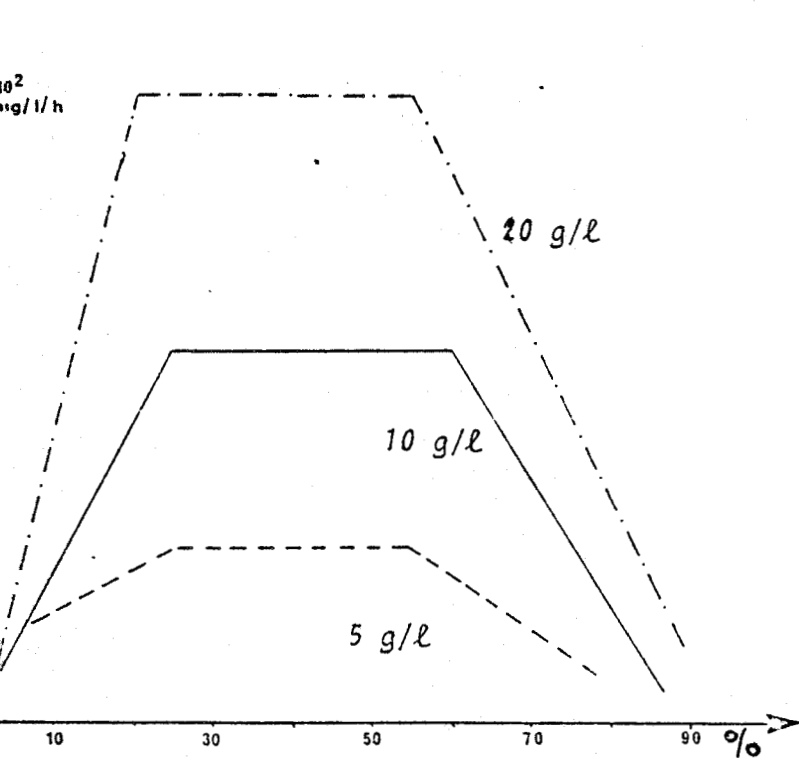
D.2.- A pH régulé (pH 7,4), 72% de la cellulose (10 g/l initiale) sont fermentés en 48 h. (figure 33) et il n'y a pas d'accumulation de sucres dans le milieu. Après un temps de latence de 6 h., les productions d'éthanol et d'acétate sont simultanées, dès le début de la fermentation. Par contre, la production de lactate ne débute réellement qu'après 24 h. de culture. La production d'éthanol est favorisée par la régulation du pH, et le rapport éthanol/acétate passe de 1,25 (pH non régulé) à 1,64 (pH régulé). Le rendement en éthanol, en conditions optimales de croissance de la souche TC 11, est de 1 mole/mole d'équivalent anhydroglucose fermentée. La production de lactate est plus importante par contre en cours d'acidification du



**FIGURE n° 34 - CINETIQUE D'APPARITION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES EXCRETEES PAR LA SOUCHE TC 11 -**

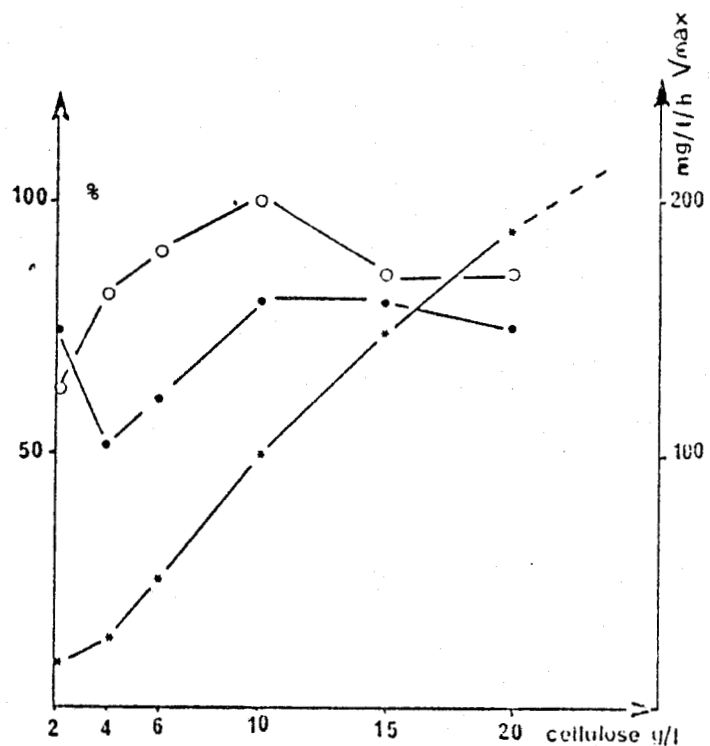
La fermentation de la cellulose a été réalisée sur milieu K2, 20 g/l de cellulose initiale.

les activités CMC asique (▲) et avicelasique (△) sont exprimées en mg d'équivalent glucose libérés respectivement pendant 30 min. et 1 h./mℓ. la biomasse (○) est mesurée par densité optique (à 680 nm). la cellulose résiduelle est donnée en g/l (\*) et estimée par pesée.



**FIGURE n° 36 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR LA SOUCHE TC 11 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN CELLULOSE -**

la vitesse d'hydrolyse (en mg/l/h) est représentée en fonction du pourcentage de dégradation.



**FIGURE n° 35 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CELLULOSE SUR LA VITESSE DE DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR C. THERMOCELLUM TC 11**

vitesse maximale d'hydrolyse (\*) en mg/l/h (●) % de dégradation à 4 j. de culture; (○) % d'activité CMC asique à 4 j. en fonction de l'optimum observé.



milieu. Le rendement en lactate est en effet de 0,7 mole/mole fermentée à pH non régulé et de 0,3 mole/mole fermentée à pH régulé. Outre la modification du métabolisme vers la production d'éthanol, à pH régulé la vitesse maximale de dégradation de la cellulose est multipliée par un facteur 4 (470 mg de cellulose/l/h), la croissance bactérienne et donc la production de cellulases étant favorisées.

D.3.- Activités cellulasiqes : L'excrétion des activités endo-glucanasiques dans le milieu de culture, par C. thermocellum TC11, est corrélée à la croissance bactérienne et à la dégradation de la cellulose (figure 34). L'activité mesurée sur CMC apparaît en effet dès le début de croissance de la souche TC 11. L'activité CMCasique optimale est retrouvée après 48 h de culture, en fin de croissance bactérienne, et reste à peu près stable dans le milieu. L'activité exo-glucanasique, mesurée sur cellulose Avicel, est par contre faible et n'apparaît réellement qu'en fin de croissance bactérienne, lorsque 80% du substrat sont hydrolysés.

D.4.- En fonction de la concentration en cellulose : La vitesse de dégradation de la cellulose augmente proportionnellement à la concentration initiale en cellulose, jusqu'à 20 g/l (figure 25). Des concentrations supérieures (jusqu'à 40 g/l) seraient donc à tester de façon à déterminer la concentration optimale en cellulose pour une croissance et une production d'enzymes optimales.

Contrairement à la souche mésophile MC 4, quelque soit la concentration en cellulose initiale, la vitesse maximale d'hydrolyse reste constante entre 20 et 60% de dégradation, sans qu'il y ait inhibition des cellulases par les produits de la fermentation (figure 36).

La croissance bactérienne et donc la production d'enzymes augmentent avec la concentration en cellulose. L'optimum d'activité CMCasique est retrouvé avec une concentration initiale de 10 g/l de cellulose (figure 35). Avec des concentrations supérieures, l'activité CMCasique résiduelle chute légèrement (-15%), bien que la vitesse d'hydrolyse de la cellulose soit supérieure. Il est probable que cette chute d'activité soit due aux quantités de cellulose résiduelles plus importantes. NG et al. (1977) ont en effet montré que les cellulases de

C. thermocellum ont une grande affinité pour la cellulose : 50% de l'activité totale de fin de culture est adsorbée par seulement 500 mg de cellulose.

#### E.- DISCUSSION - CONCLUSIONS

C. thermocellum est actuellement une espèce bactérienne définie comme fermentant activement la cellulose et le cellobiose en produisant un colorant jaune-orangé liposoluble (Mc BEE, 1950; NG et al., 1977).

Cependant, l'ensemble des études que nous avons effectuées sur les différents isolats de C. thermocellum ont permis de mettre en évidence de nombreuses variations au sein de cette espèce, tant sur le plan morphologique que fermentaire et enzymatique.

Du point de vue morphologie, nous n'avons jamais observé de longues formes filamenteuses, contrairement aux descriptions de NG et al. (1977) et ZEIKUS (1979).

La fermentation des oses (glucose et fructose en particulier) par C. thermocellum reste très controversée. Cette propriété semblait étroitement conditionnée par la présence de fortes concentrations d'extrait de levure (PATNI et ALEXANDER, 1977 a et b), ou due à une lente adaptation des souches (NG et ZEIKUS, 1982). Nous ne l'avons pas observée au cours de nos essais chez la majorité des isolats. Seule une souche s'est réellement adaptée sur glucose et fructose (la souche N 213 22). Cette adaptation n'a été possible qu'à une température d'incubation de 60°C, à 65°C aucune croissance des souches n'ayant été observée. L'induction des enzymes responsables ne se fait donc pas dans les conditions optimales de croissance de C. thermocellum. PATNI et ALEXANDER (1977 a et b), au cours de leurs travaux, ont mis en évidence la présence de ces enzymes chez des souches de C. thermocellum cultivées à 50 et 55°C. De faibles températures seraient alors nécessaires à l'induction des glucokinases, en présence de glucose, et des PEP fructose phosphotransférase et fructose 1P kinase, en présence de fructose.

Au cours de l'étude de la dégradation de la cellulose par la souche TC 11, nous avons obtenu une accumulation de sucres dès que le pH était inférieur à 7,0. Le système cellulasique extracellulaire de C. thermocellum a en effet une activité optimale à pH acide: de pH 5,0 à

pH 6,0 (NG et al., 1977 ; AIT et al., 1982 ; PETRE et al., 1982 ; NG et ZEIKUS, 1981 a). Les sucres accumulés en fin de culture sont essentiellement du glucose et du cellobiose (GORDON et al., 1978 ; NG et ZEIKUS, 1982), et environ 40% du substrat s'accumulent, lorsque le pH n'est pas régulé, sans qu'il y ait inhibition des cellulases, ce qui confirme les résultats obtenus par NG et al. (1977).

Les activités endo et exo-glucanasiques retrouvées en fin de culture restent stables dans le milieu. NG et al. (1977) n'observent en effet pas d'activités protéolytiques chez C. thermocellum. Nous n'avons pas dosé l'activité  $\beta$  glucosidasique dans nos surnageants. Cette enzyme est en effet localisée dans l'espace périplasmique des cellules (AIT et al., 1982) et très peu détectable dans le milieu de culture (NG et al., 1977).

Les premiers résultats obtenus au laboratoire par B. PRIEM et P. DEBEIRE, indiquent d'autre part des différences importantes dans le système cellulastique de la souche TC 11, comparativement aux résultats publiés sur C. thermocellum. En particulier, la purification des hydrolases de la souche TC 11 laisse supposer l'excrétion par cette souche de protéines de bas poids moléculaire. LAMED et al. (1983), par contre, ont mis en évidence chez plusieurs souches de C. thermocellum un complexe enzymatique de très haut poids moléculaire (supérieur à 200 Kdaltons).

La souche TC 11 adhère fermement aux fibres de cellulose, et d'après nos observations cet attachement se ferait par l'intermédiaire d'un pédoncule situé à l'extrémité opposée à la spore. BAYER et al. (1983) ont récemment étudié l'attachement de C. thermocellum, mais ces auteurs ne mentionnent pas de caractéristiques morphologiques propres à cette espèce bactérienne et responsable de l'attachement des cellules sur les fibres de cellulose. De tous récents travaux (LJUNDAHL et al., 1983) ont d'autre part mis en évidence que le colorant jaune produit par C. thermocellum intervient dans la cellulolyse comme facteur d'affinité permettant l'attachement des enzymes, et probablement des bacilles. Certains de nos isolats ne produisent pas ce colorant, au cours de leur croissance sur cellulose ou cellobiose, et nous n'avons pas observé de relations entre la vitesse de croissance des souches et l'excrétion de ce pigment.

Malgré toutes les variations que nous avons pu observer au sein de cette espèce bactérienne, les résultats que nous avons obtenus par l'étude électrophorétique des protéines, sur gel de polyacrilamine, permettent de constater une homogénéité dans le groupe des différents biotypes de C. thermocellum.

Ce travail de différenciation des biotypes de C. thermocellum serait donc à poursuivre d'une part en affinant la séparation des protéines bactériennes, d'autre part, par l'étude plus fine des systèmes hydrolytiques des différentes souches existantes.

III.- ETUDE DE DEUX SOUCHES XYLANOLYTIQUES THERMOPHILES : CLOSTRIDIUM  
SP TC 21 ET TX 41

Clostridium sp. TC 21 et Clostridium sp. TX 41 ont été isolées respectivement de fumier de bovin (écosystème IV) et d'un digesteur de lentilles d'eau (écosystème I).

A.- COLONIES ET MORPHOLOGIE

Sur milieu gélosé au xylane, les souches TC 21 et TX 41 forment des colonies de 1 mm de diamètre, en trois jours, entourées d'une zone claire de lyse. Sur milieu au cellobiose, ces colonies sont plus grosses (1,0-1,5 mm de diamètre en 48 h). Morphologiquement ces colonies sont rondes, et non pigmentées, à l'exception de celles de la souche TX 41 qui ont un bord irrégulier. De plus les colonies formées par la souche TC 21 sur milieu gélosé à la cellulose sont très petites et ne dépassent pas 0,2-0,4 mm de diamètre, en 15 jours.

Les cellules végétatives sont des bacilles droits ou légèrement incurvés (figure 37). La souche TX 41 est plus allongée (3,4-4,5  $\mu\text{m}$  x 0,3-0,4  $\mu\text{m}$ ) que la souche TC 21 (1,8-2,0 x 0,3-0,4  $\mu\text{m}$ ). Cette dernière n'est pas mobile et après coloration négative, nous n'avons pas observé de flagelles ni de fimbriae. La souche TX 41 par contre est mobile et à flagellation péritriche (figure 38).

Ces bacilles ne prennent pas la coloration de GRAM et le test au KOH de GREGERSEN (1978) donne des résultats positifs. Toutefois, les coupes ultrafines en microscopie électronique ne mettent pas en évidence de membrane externe chez ces deux isolats (figure 39). La paroi de ces bactéries a une épaisseur de 28 nm et après freeze-etching et coloration négative, la surface de cette paroi montre un arrangement tétragonal des protéines (figure 40).

Pendant la sporulation les cellules individuelles s'allongent jusqu'à 7  $\mu\text{m}$ . Les spores apparaissent fréquemment sur milieu gélosé et pendant la phase stationnaire de croissance en milieu liquide. Ces

FIGURE n° 37 - PHOTOGRAPHIE EN CONTRASTE DE PHASE DE LA SOUCHE TX 41 -  
(-) est équivalent à 10  $\mu$ m

FIGURE n° 38 - COLORATION NEGATIVE DE CELLULES DE CLOSTRIDIUM SP. TX 41 -

FIGURE n° 39 - COUPE ULTRA-FINE DE LA SOUCHE TC 21 -

C.M.: membrane cytoplasmique; C.W.: paroi; (-) équivaut 0,1  $\mu$ m.

fig. 3 a) noter l'apparence multi feuillet de la paroi

fig. 3 b) noter l'arrangement régulier des protéines de surface

FIGURE n° 40 - MICROGRAPHIE DE LA PAROI DE LA SOUCHE TC 21 PREPAREE PAR  
FREEZE ETCHING - (-): 0,1  $\mu$ m.

FIGURE n° 41 - MICROGRAPHIE DE L'ENDOSPORE DE LA SOUCHE TC 21 -

C.W.: paroi; C.Y.: cytoplasme; S.C: corps de la spore; G.C.W.: paroi de la spore

C.X.: cortex; O.S.M.: membrane extreme de la spore. (-): 0,05  $\mu$ m

FIGURE n° 42 - MICROGRAPHIE DE LA SPORE DE LA SOUCHE TC 21 PREPAREE PAR  
FREEZE ETCHING -

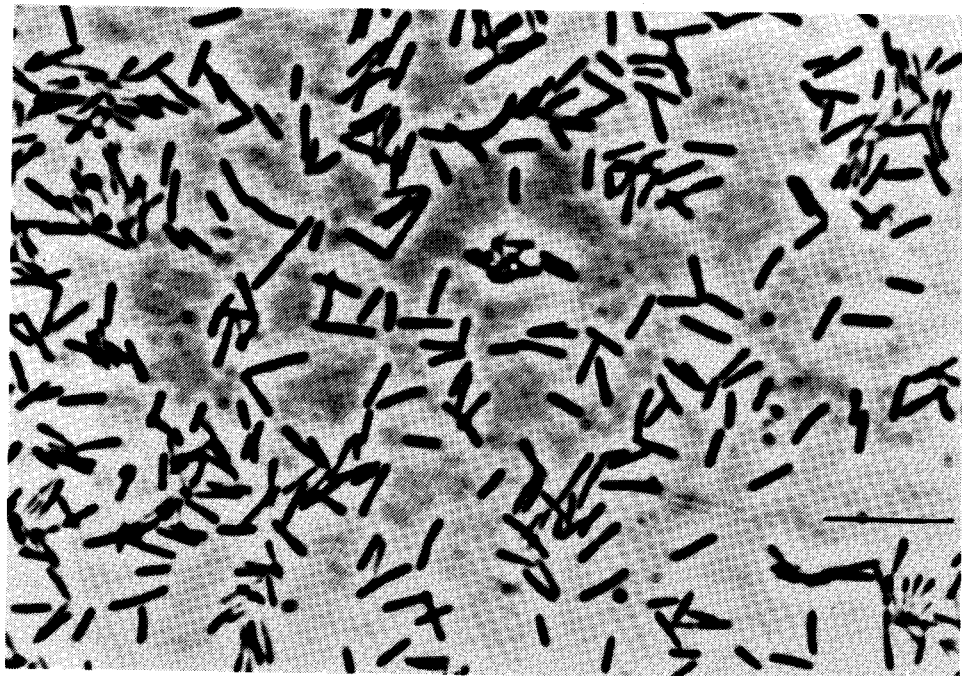
FIGURE n° 43 - PROFIL ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES DES CLOSTRIDIA  
THERMOPHILES -

(1) *C. thermohydrosulfuricum*; (2) *C. thermosaccharolyticum*;

(3) *C. thermolacticum* TX 41; (4) *C. thermolacticum* TC 21;

(5) *C. stercorarium*; (6) *C. thermocellum*.

les poids moléculaires sont exprimés en Kdaltons.



-FIGURE n° 37-



-FIGURE n° 38-

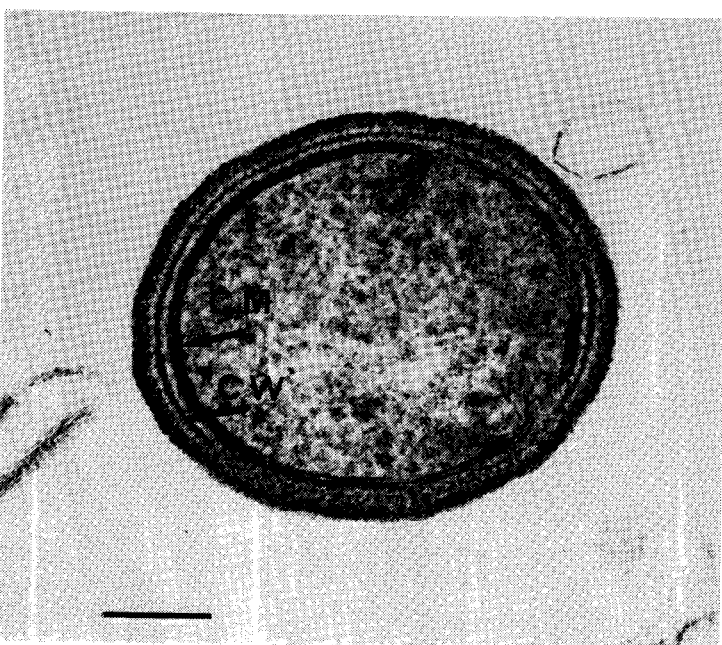


FIGURE n° 39 a

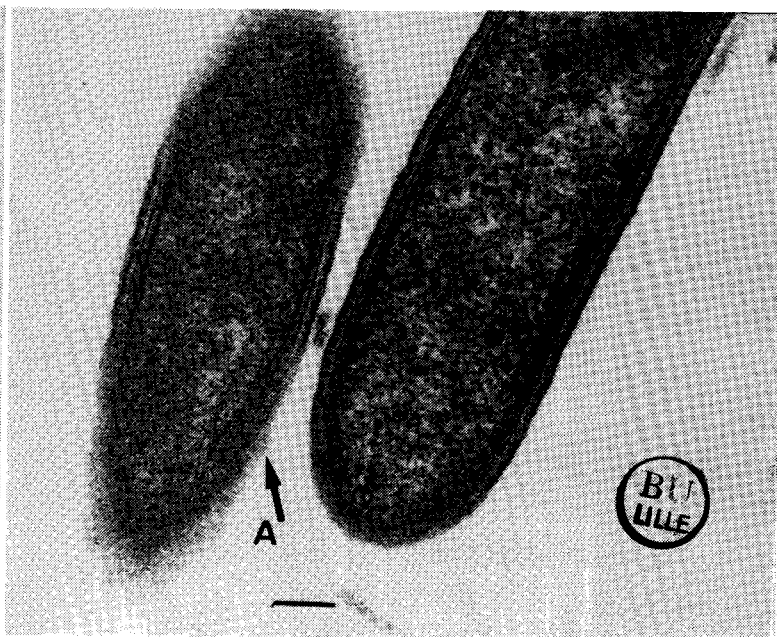
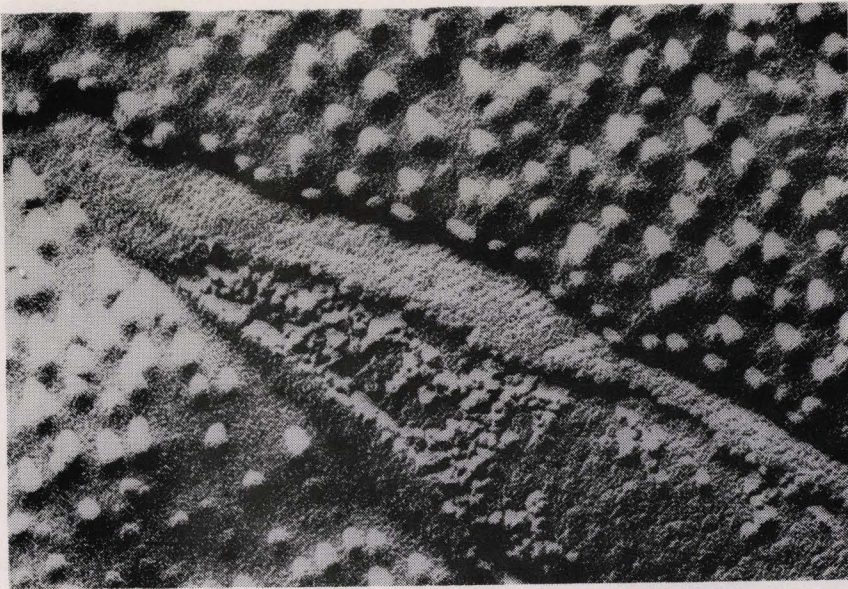
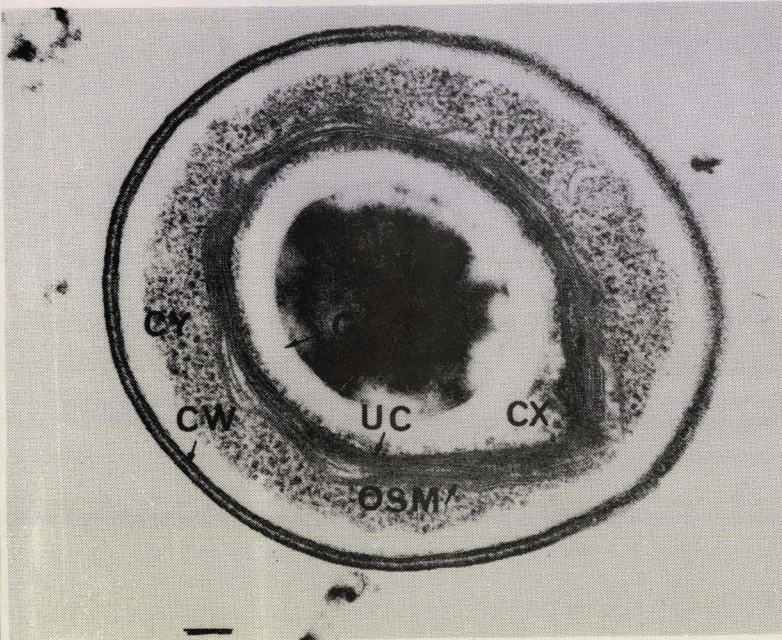


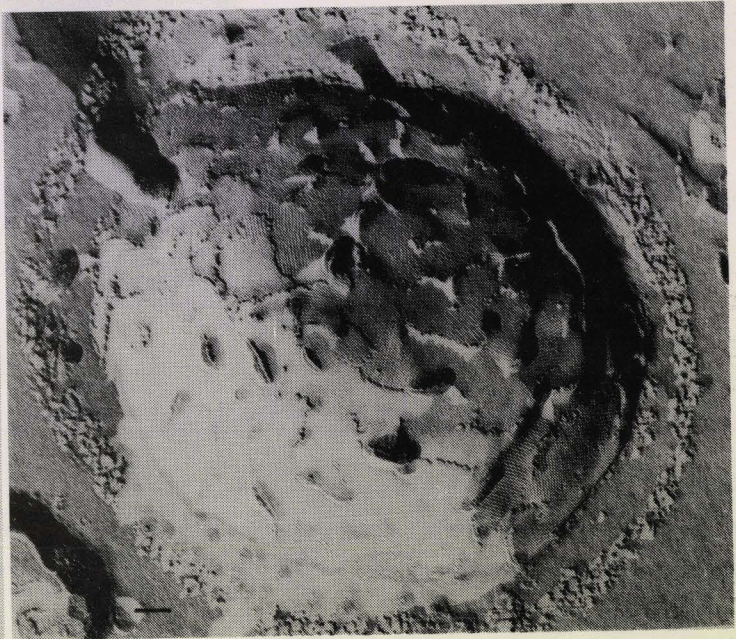
FIGURE n° 39 b



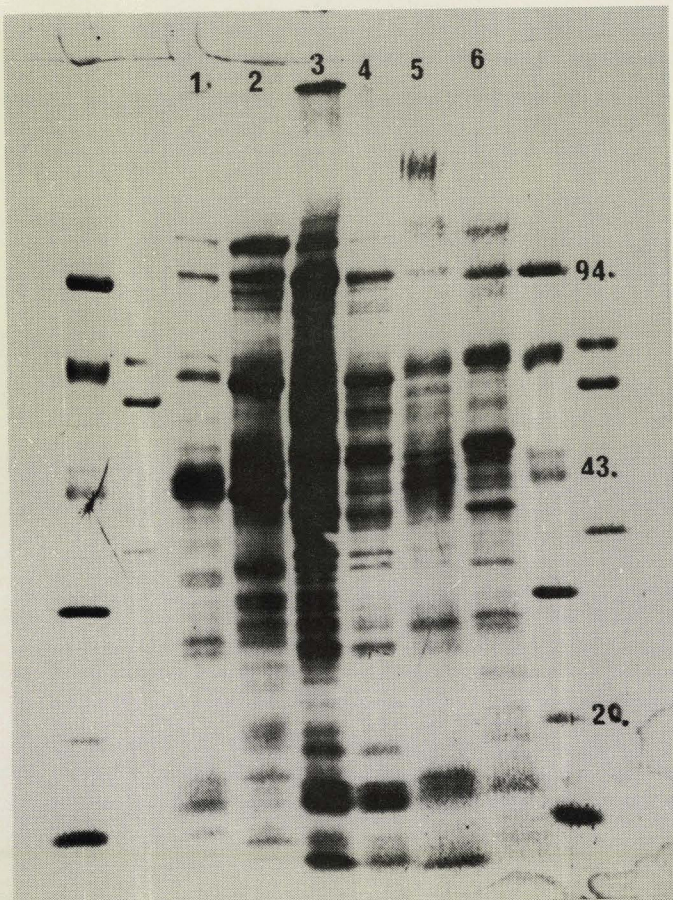
- FIGURE n° 40-



- FIGURE n° 41 -



- FIGURE n° 42 -



- FIGURE n°43-



spores sont rondes ou légèrement ovales, déformantes et terminales (figure 41). Par freeze-etching, nous observons un arrangement parallèle des protéines à la surface de la spore (figure 42).

La composition en base de l'A.D.N. de Clostridium sp. TC 21 et TX 41 est respectivement de 42,3 et 40,9 % moles G+C.

#### B.- ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES CELLULAIRES

L'étude électrophorétique des protéines cellulaires des souches TC 21 et TX 41 les différencie nettement des autres Clostridia thermophiles : C. thermocellum DSM 1237, C. stercorarium, C. thermosaccharolyticum DSM 571 et C. thermohydrosulfuricum DSM 567 (figure 43). Tous ces Clostridia présentent des protéines communes en particulier de 150 et 65 Kdaltons. Toutefois leur profil protéique lu par densitométrie (figure 44) met en évidence des différences notables entre ces différentes bactéries séparant ainsi le groupe TC 21 et TX 41 des autres Clostridia connus. En particulier ces nouveaux isolats ont des protéines de 200 Kdaltons mais ne possèdent pas de protéines de 180 et 80 Kdaltons. Le profil protéique des souches TC 21 et TX 41 est très voisin, seules de légères différences sont observées surtout dans les bandes de 27 et 20 Kdaltons.

#### C.- CROISSANCE ET BESOINS NUTRITIONNELS

L'optimum de température de croissance est de 60-65°C (figure 45) et la croissance a lieu de 50°C (température minimale) à 70°C (température maximale).

Le pH optimum de croissance est de 7,0-7,2 (figure 46) et aucune croissance n'est obtenue si le pH est inférieur à 6,6 ou supérieur à 7,6.

Les souches TC 21 et TX 41 sont capables d'utiliser une grande variété de sources de carbone (tableau 28) dont le xylane et l'amidon, la souche TC 21, d'autre part, fermente lentement la cellulose.

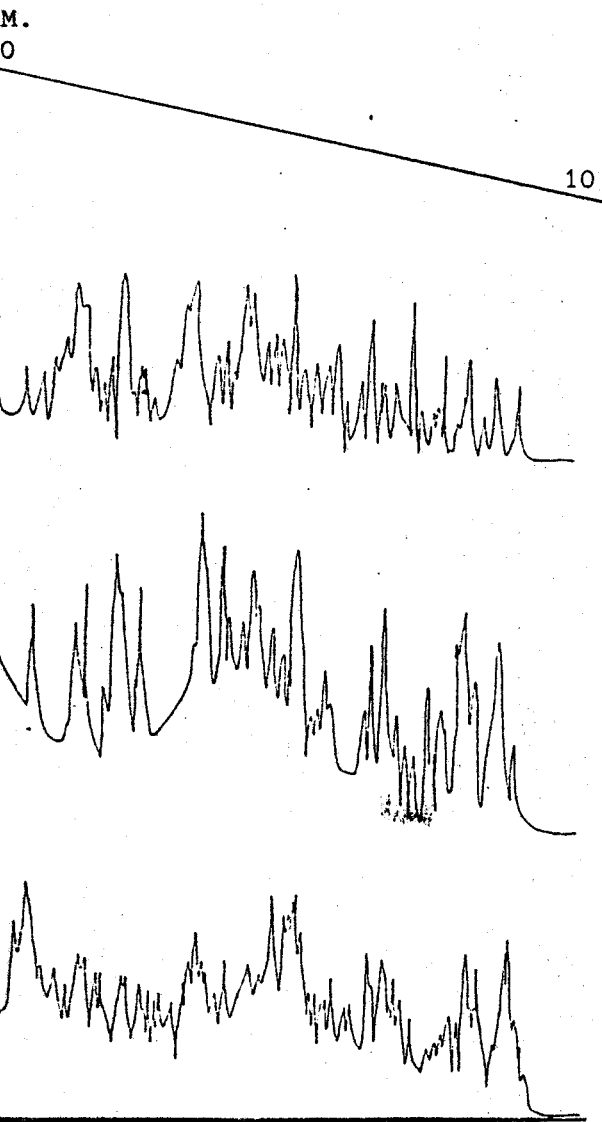


FIGURE n° 44 - PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES BACTERIENNES lu par densitométrie -  
A: *C. stercorarium*; B: *C. thermolacticum*  
souche TC 21; C: *C. thermocellum*  
les poids moléculaires sont en Kdaltons

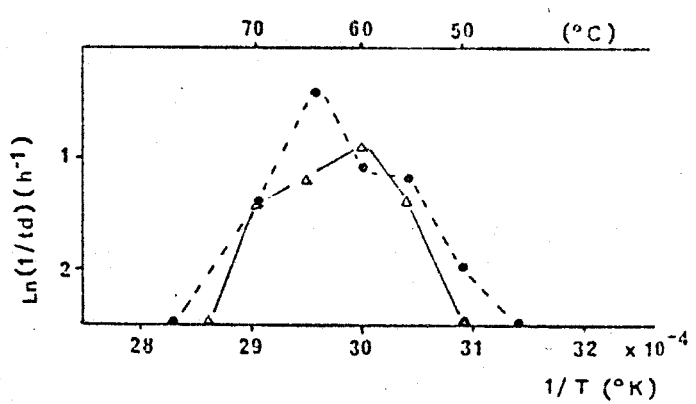


FIGURE n° 45 - CROISSANCE DE *C. THERMOLACTICUM* EN FONCTION DE LA TEMPERATURE  
le Log du taux de croissance ( $1/t_d$ ;  $t_d$  = temps de doublement) est exprimé en fonction de  $1/T$  (en °K)  
(•) souche TC 21; (Δ) souche TX 41

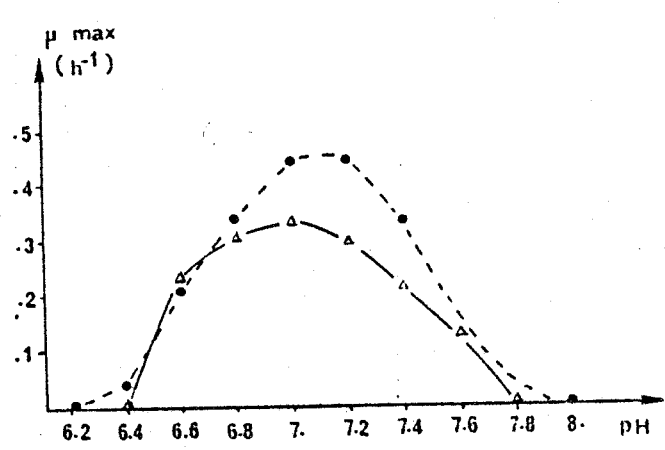


FIGURE n° 46 - INFLUENCE DU pH SUR LE TAUX DE CROISSANCE DE *C. THERMOLACTICUM* -  
(•) souche TC 21; (Δ) souche TX 41

EXTRAITS FERMENTES PAR LES DEUX SOUCHES			
xylose	glucose	lactose	
cellobiose	fructose	melibiose	
ribose	saccharose	raffinose	
mannose	maltose	rhamnose	
EXTRAITS NON FERMENTES			
sorbitol	glycerol		
mannitol			
cellulose est fermentée par la souche TC 21			
melixitose est fermenté par la souche TX 41			

EXTRAIT DE LEVURE (g/l)	CELLULOSE DEGRADEE (%)	PRODUITS FINAUX (ml/l)		
		éthanol	acétate	lactate
0,5	15,6	7,4	6,3	0,4
1	24,1	13,0	8,2	1,2
2	26,0	20,8	10,2	2,1
4	28,5	23,3	11,7	2,5
6	28,5	21,1	12,3	2,2

TABEAU n° 29 - DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR LA SOUCHE TC 21 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN EXTRAIT DE LEVURE -

TABEAU n° 28 - CAPACITE FERMENTAIRE DES SOUCHES A ET TX 41 -  
Les tests de fermentation ont été réalisés en bouillon de 10 ml, milieu K2, 5 g/l de substrat.

Les cultures ont été réalisées en flacons de 10 ml, milieu KYM, 10 g/l de cellulose initiale (phi 7,2); les dosages ont été faits après 15 jours d'incubation à 65°C.

	GLUCOSE	XYLOSE	AMIDON	XYLANE
substrat initial (1)	55,5	66,7	61,7	75,7
acétate (1)	2,2(10,6)	1,84(15,7)	5,5(27,75)	7,5(29,3)
éthanol	4,35(20,9)	2,2(18,8)	9,7(43,9)	7,8(30,54)
lactate	35,0(168,5)	15,4(132,1)	25,4(128,4)	27,3(106,8)
H <sub>2</sub>	4,4(21,2)	3,4(31,5)	11,0(55,5)	15,0(58,7)
CO <sub>2</sub>	6,6(31,8)	4,0(34,6)	14,0(71,6)	15,3(59,8)
sucres réducteurs	33,33	50,0	12,2	18,7
% C. fermenté	39,0	23,2	52,2	58,5
O/R index	1,01	1,0	1,0	0,99
rendement en lactate (2)	1,68	1,32	1,28	1,06
V max (mg/l/h)	96,0	70,4	96,2	129,2

TABLEAU n° 30 - BILANS DE FERMENTATION DES DIFFERENTS SUBSTRATS PAR LA SOUCHE TC 21

A PH NON REGULE (pH i de 7,0)

Les fermentations ont été réalisées en flacons de 300 ml, milieu K2, 10 g/l de substrat, la durée d'incubation était de 4 jours, à 65°C.

(1) les résultats sont exprimés en ml; entre ( ) en mmole/100 mmole fermentées

(2) le rendement en lactate est exprimé en mole/mole d'équivalent glucose ou xylose fermentée.

	GLUCOSE	XYLANE	AMIDON	CELLULOSE
substrat initial (1)	29,3	75,7	61,7	30,8
acétate (1)	10,2(36,2)	4,3(9,9)	5,3(15,8)	23,0(80,7)
éthanol	27,6(97,8)	8,0(18,4)	12,8(37,6)	32,0(112,4)
lactate	18,8(66,7)	60,2(138,4)	49,5(146,4)	2,0(0,67)
H <sub>2</sub>	20,4(72,4)	8,6(19,0)	10,6(31,0)	46,0(161,4)
CO <sub>2</sub>	37,8(134,0)	12,3(28,3)	18,1(53,3)	55,0(193,0)
sucres réducteurs	1,4	7,6	27,8	-
bilan carbone	100,7	82,0	99,9	92,5
% de fermentation	100	57,5	54,8	92,5
C/R index	1,1	1,0	1,0	1,0
rendement lactate (2)	0,67	1,38	1,46	0
V max (mg/l/h)	1180,0	211,0	280,0	100,0

TABLEAU n° 31 - BILANS DE FERMENTATION DES DIFFERENTS SUBSTRATS PAR LA SOUCHE TC 21, A PH REGULE

Les fermentations sont réalisées en fermenteurs de 2 litres, à 65°C, le pH est réglé à 7,0 par de la soude 5N.

(1) les résultats sont exprimés en ml; entre ( ) en mmole/100 mmole fermentées

(2) le rendement en lactate est exprimé en mole/mole d'équivalent glucose ou xylose fermentée.

Ni l'extrait de levure, ni les hydrolysats de caséine ne permettent la croissance sans le support d'un substrat carboné. Ces deux isolats peuvent utiliser les hydrolysats de caséine comme source d'azote, mais seulement en présence de vitamines. L'extrait de levure par contre sert à la fois de source d'azote et de vitamines. Des concentrations croissantes d'extrait de levure favorisent la croissance de ces souches (figures 47 et 48). Mais une concentration de 0,5 g/l seulement permet un bon développement de ces isolats, et au cours de nos études, nous avons généralement utilisé cette concentration en extrait de levure. De même que la croissance, l'hydrolyse de la cellulose est favorisée par des quantités d'extrait de levure plus importantes : jusqu'à 4 g/l (tableau 29). Même en présence de vitamines, ces deux isolats ne peuvent utiliser le chlorure d'ammonium comme source d'azote.

Les sulfates, le thiosulfate et le sulfite ne sont pas réduits en  $H_2S$ . Les nitrates ne sont pas réduits, et contrairement à l'esculine, ni la gélatine ni l'urée ne sont hydrolysées.

#### D.- CINETIQUES ET BILANS DE FERMENTATION PAR CLOSTRIDIUM SP. TC 21

##### D.1.- Fermentation du glucose et du xylose:

A pH non régulé: sur ces deux substrats la fermentation débute après un temps de latence de 30 h (xylose) et 48 h (glucose) (figures 49 et 50) et se traduit par une production de lactate avec un rendement de 1,68 moles/mole de glucose fermentée et 1,32 moles/mole de xylose fermentée (tableau 30). Cette souche ne produit que du L(-) lactate, nous n'avons en effet pas observé de D(+) lactate par utilisation successive de L(-) et D(+) lactate déshydrogénase, selon la méthode de BOERHINGER.

L'utilisation de ces deux substrats est lente et seulement 39% du glucose et 29% du xylose initiaux sont fermentés. Cette souche fermente toutefois plus rapidement le glucose ( $V_{max} = 96$  mg/l/h) que le xylose ( $V_{max} = 70,4$  mg/l/h). Cet isolat incorpore le substrat carboné en début de croissance, et après lyse bactérienne il y a relargage, dans le milieu, des sucres non fermentés. 39% du xylose utilisé par la souche

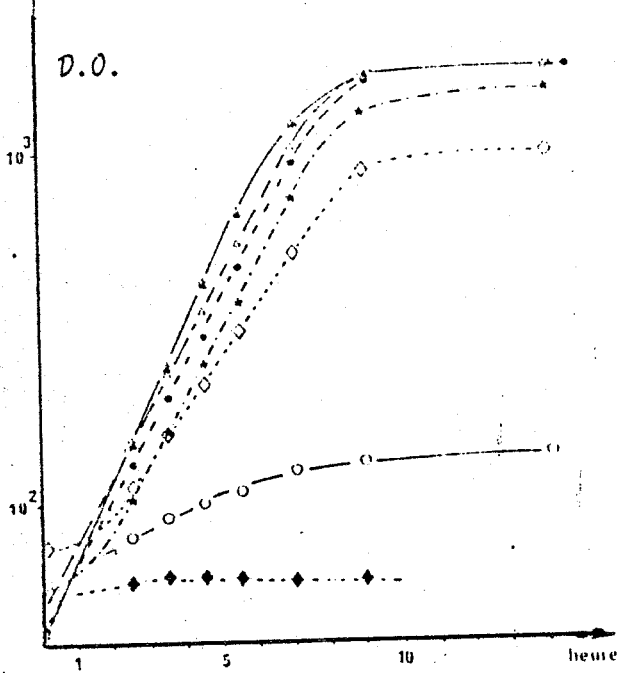


FIGURE n° 47 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN EXTRAIT DE LEVURE SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE TC 21 -

(○) 0; (◇) 0,5; (\*) 1; (●) 2; (△) 3; (▲) 4; (★) 5 g/l d'extrait de levure.

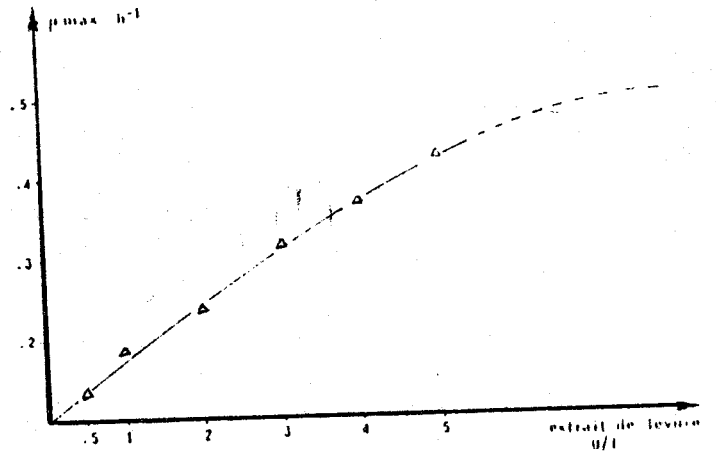


FIGURE n° 48 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN EXTRAIT DE LEVURE SUR LE TAUX DE CROISSANCE DE LA SOUCHE TX 41 -

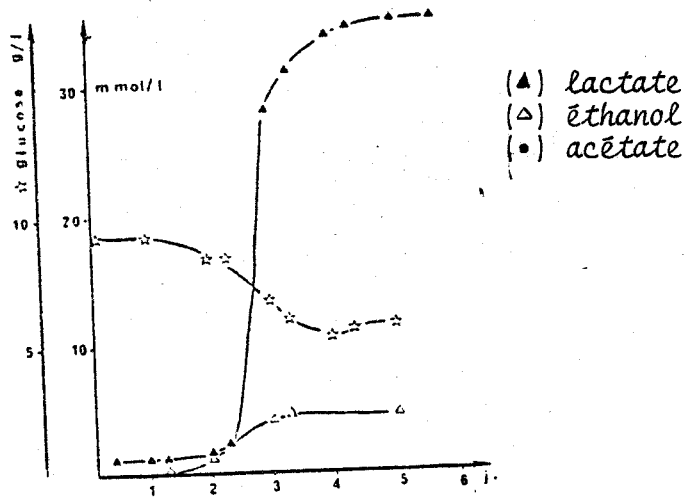


FIGURE n° 49 -

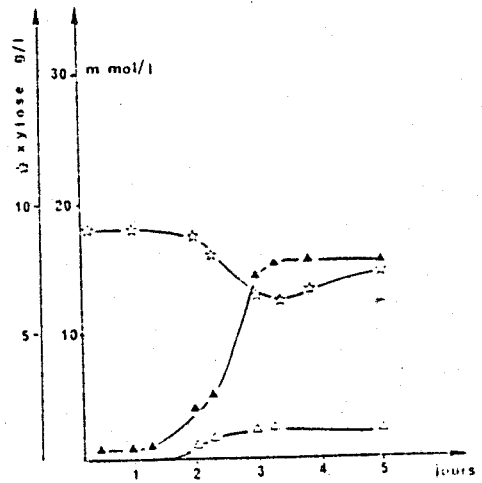


FIGURE n° 50 -

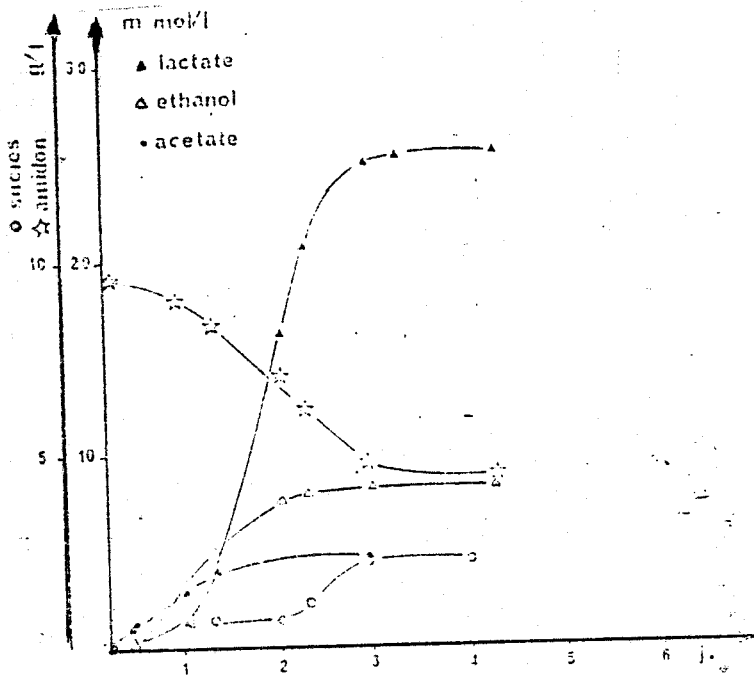


FIGURE n° 52 -

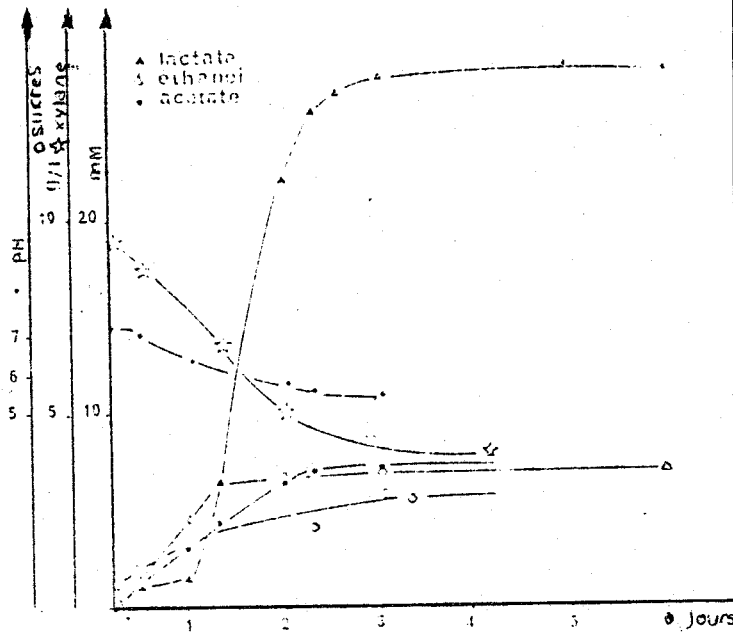


FIGURE n° 53 -

CINETIQUES DE FERMENTATION DU GLUCOSE (fig. 49) DU XYLOSE (fig. 50) DE L'AMIDON (fig. 52) ET DU XYLANE (FIG. 53) A pH NON REGULE (pH 7,2), en flacons de 300 ml, milieu KVEM, 0,5 g/l d'extrait de levure

TC 21 sont ainsi incorporés sans être métabolisés, par contre sur glucose, il n'y a relarguage en fin de culture que de 8% du sucre utilisé.

A pH régulé: la fermentation du glucose (5 g/l) est plus rapide et la vitesse maximale de disparition du sucre est de 1,18 g/l/h. L'incorporation de ce substrat est rapide : à 5 h. de culture 5,25 g/l de glucose ont été consommés dont 92% sont incorporés dans les cellules bactériennes et seulement 8% fermentés (figure 51). Ce substrat incorporé est ensuite métabolisé progressivement et au maximum de D.O. observé (à 9 h. de culture), seulement 22% du glucose restent incorporés dans les cellules. La fermentation se fait alors en deux étapes. Pendant la phase exponentielle de croissance, le lactate est le principal métabolite formé. Par contre, au moment de la lyse bactérienne, il y a relarguage de glucose (1,2 g/l) ; le glucose total disponible (1,36 g/l) est alors insuffisant par rapport à la masse bactérienne, les cellules se retrouvent en limitation de substrat, et leur métabolisme est alors dévié vers la production d'éthanol aux dépends de celle d'acétate et de lactate.

#### D.2.- Fermentation de l'amidon et du xylane :

A pH non régulé: (figures 52 et 53) contrairement à la fermentation du glucose et du xylose, celle de l'amidon et du xylane débute après un temps de latence court d'environ 6 h.. Sur ces deux polymères, les cellules bactériennes n'incorporent pas le substrat, et les vitesses maximales de dégradation de l'amidon et du xylane sont respectivement de 96,2 et 129,2 mg/l/h. Si cette vitesse sur amidon est identique à celle sur glucose, à l'inverse, la vitesse d'utilisation du xylane est 1,8 fois plus élevée que celle d'utilisation du xylose (tableau 30). Durant les premières heures de culture, la souche TC 21 ne produit que de l'acétate et de l'éthanol, la production de lactate ne débutant qu'après 24 h. de culture. Cette production de lactate est plus faible que sur sucres simples et se traduit par un rendement de 1,3 moles/mole d'équivalent glucose fermentée sur amidon, et de 1,07 moles/mole d'équivalent xylose fermentée sur xylane.

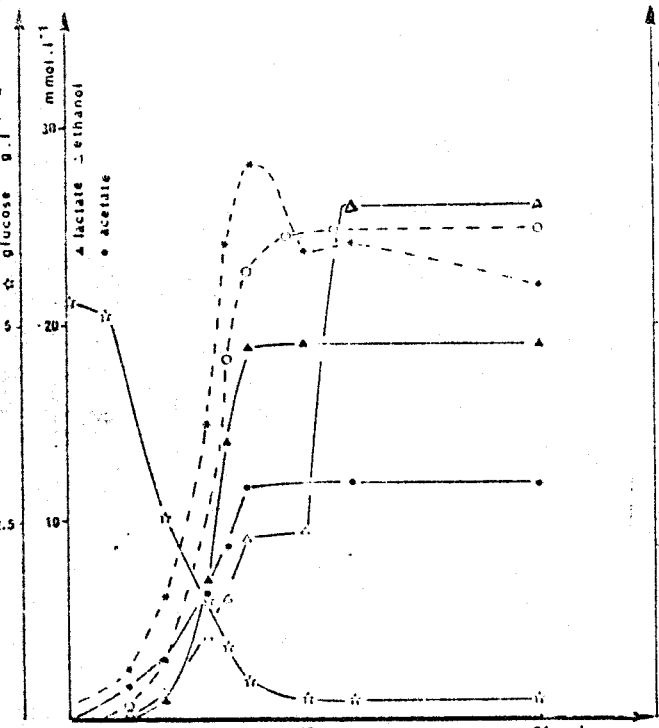


FIGURE n° 51 - CINETIQUE DE FERMENTATION DU GLUCOSE PAR LA SOUCHE TC 21, A PH REGULE (pH 7,0)

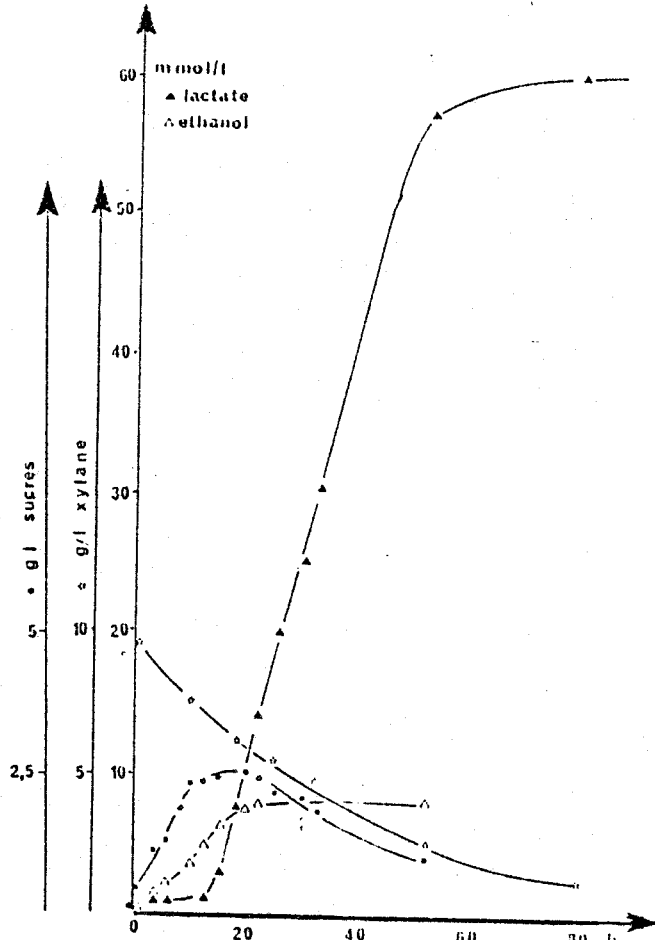


FIGURE n° 54 - CINETIQUE DE FERMENTATION DU XYLANE PAR LA SOUCHE TC 21, A PH REGULE (pH 7,0) -

la fermentation du glucose (5 g/l), de l'amidon (10 g/l) et du xylane (10 g/l) a été suivie en fermenteurs de 2 l. à 65°C le pH est régulé par de la soude 5N.

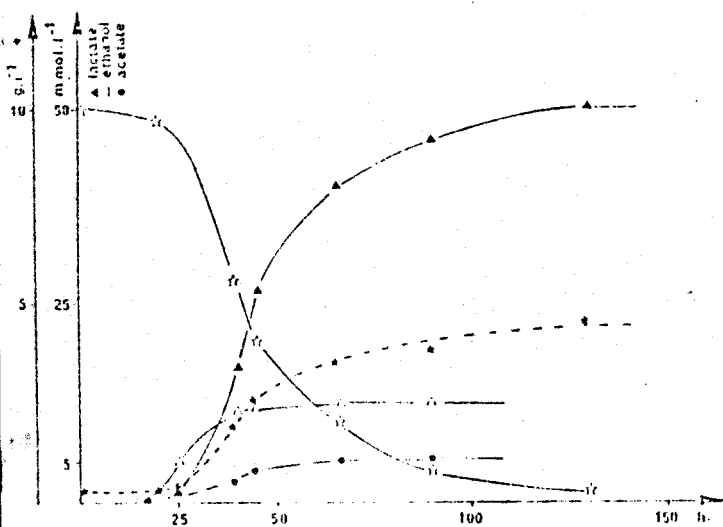


FIGURE n° 55 - CINETIQUE DE FERMENTATION DE L'AMIDON PAR LA SOUCHE TC 21, A PH REGULE (pH 7,0)

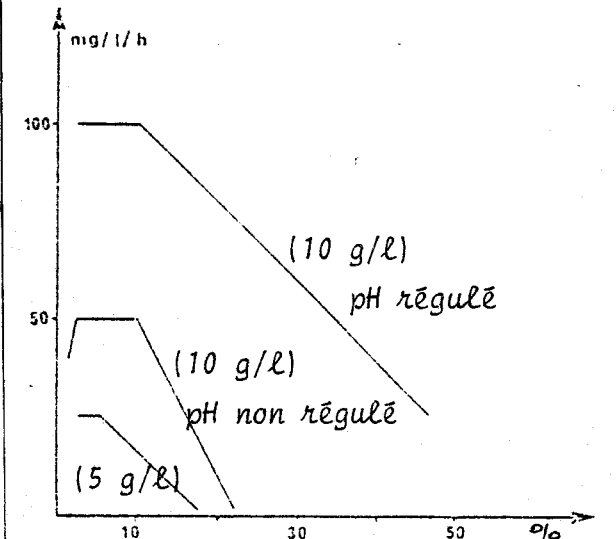


FIGURE n° 57 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR LA SOUCHE TC 21, en fonction de la concentration en cellulose et de la régulation du pH

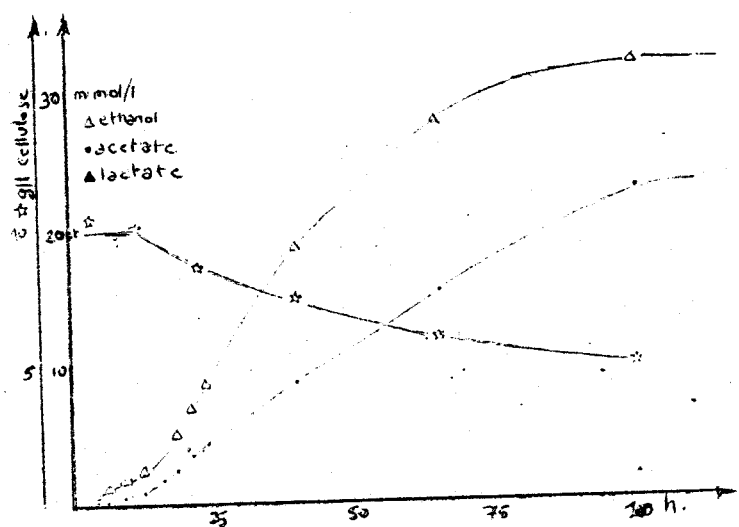


FIGURE n° 56 - CINETIQUE DE DEGRADATION DE LA CELLULOSE (10 g/l) PAR LA SOUCHE TC 21, A PH REGULE (pH 7,0) milieu KYEM, 1 g/l d'extrait de levure

A pH régulé (pH 7,0): l'hydrolyse du xylane commence dès les premières heures de culture (figure 54) et se traduit par une accumulation de sucres (jusqu'à 2,5 g/l). Durant ces premières heures, la fermentation est lente et de type mixte, avec essentiellement une production d'éthanol. Lorsque la quantité de sucres accumulés est suffisante pour permettre un développement rapide des cellules bactériennes, la fermentation du xylane devient alors quasiment de type homolactique. Le rendement en lactate est de 1,38 moles/mole d'équivalent xylose fermentée (tableau 31).

La souche TC 21 hydrolyse totalement l'amidon mais n'en fermente par contre que 55% (10 g/l initiaux), 45% de l'amidon se retrouvent ainsi hydrolysés sous forme de sucres après 125 h de culture (figure 55). Dans ces conditions, le rendement en lactate est de 1,46 moles/mole fermentée (tableau 31). Les sucres accumulés au cours de cette fermentation sont essentiellement du glucose (90%), le maltose et les amyloextrines apparaissant seulement en faibles quantités.

#### D.3.- Fermentation de la cellulose

La fermentation de la cellulose à pH non régulé est très lente et seulement 15 à 30% de la cellulose sont dégradés en 15 jours de culture (tableau 29).

A pH régulé (pH 7,0), la fermentation débute après un temps de latence de 15 h. et se traduit essentiellement par une production d'éthanol et d'acétate (figure 56 et tableau 31). Sur ce substrat, la quantité de lactate formé est négligeable (2 mM). L'activité cellulastique de cette souche étant faible, les cellules se retrouvent en substrat limitant et dans ces conditions, leur métabolisme est dirigé vers la production d'éthanol. Le rendement en éthanol est alors de 1,12 moles/mole d'équivalent anhydroglucose fermentée. Contrairement à C. thermocellum TC 11, la vitesse de dégradation de la cellulose par cette souche ne reste constante que sur 10% d'hydrolyse, et cette cellulolyse se bloque très rapidement (figure 57).



	GLUCOSE	XYLOSE	AMIDON (7)	AMIDON (2)
substrat initial	27,8	33,33	39,9	61,7
acétate (3)	traces	5,0 (17,8)	5,0 (20,3)	4,0 (9,2)
éthanol	5,6 (21,1)	5,2 (18,5)	4,8 (19,5)	9,1 (18,6)
lactate	47,55 (190,0)	36,6 (130,4)	39,5 (160,2)	85,0 (173,3)
H <sub>2</sub>	traces	10,0 (35,6)	10,0 (40,6)	15,2 (27,0)
CO <sub>2</sub>	5,6 (21,1)	10,2 (36,3)	9,8 (39,7)	8,0 (16,3)
sucres réducteurs	2,8	6,0	4,7	9,0
bilan carbone	105,6	102,1	95,0	92,5
O/R index	1,0	1,0	1,0	1,0
rendement en lactate (4)	1,8	1,3	1,6	1,7
V max (mg/l/h)	114,0	131,0	92,0	146,0

TABLEAU n° 32 - BILANS DE FERMENTATION DES DIFFERENTS SUBSTRATS PAR LA SOUCHE TX 41 -

Les fermentations ont été réalisées sur glucose, xylose et amidon (1) à pH non régulé (pH 7,0) en flacons de 300 ml, milieu K2, durée d'incubation 4 jours à 65°C.

(2) la fermentation sur amidon, à pH régulé (pH 7,0) a été réalisée en fermenteur de 2 litres.

(3) Les résultats sont exprimés en mM; entre ( ) en nmoles/100 nmoles fermentées.

(4) le rendement en lactate est exprimé en mole/mole d'équivalent glucose ou xylose fermentée.

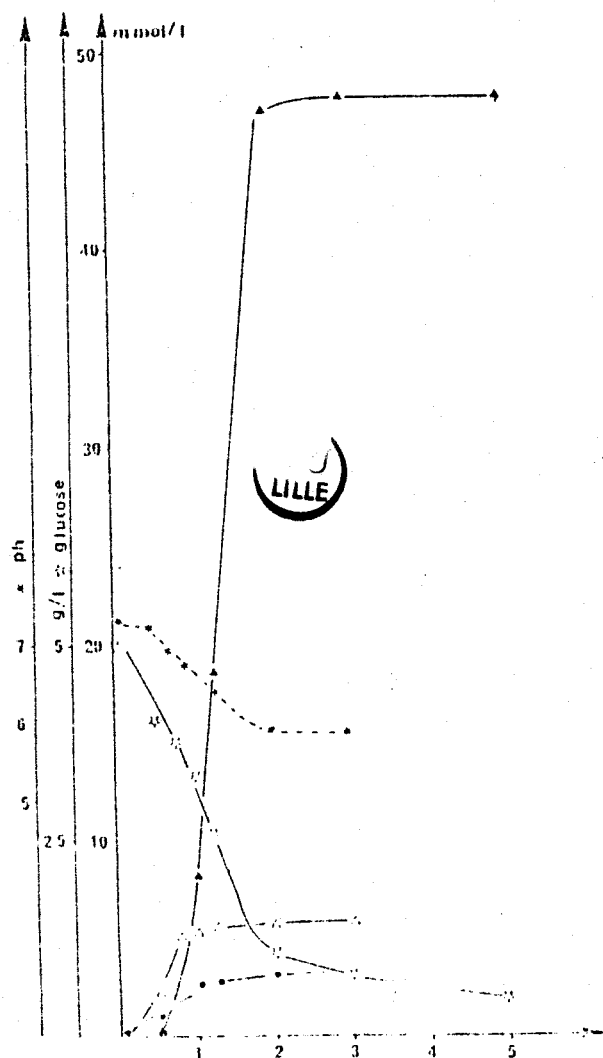


FIGURE n° 58 - CINETIQUE DE FERMENTATION DU GLUCOSE PAR LA SOUCHE TX 41 -

les fermentations du glucose et du xylose (10 g/l) ont été suivies en flacons de 300 ml milieu KYEM, 0,5 g/l d'extrait de levure, à 65°C.

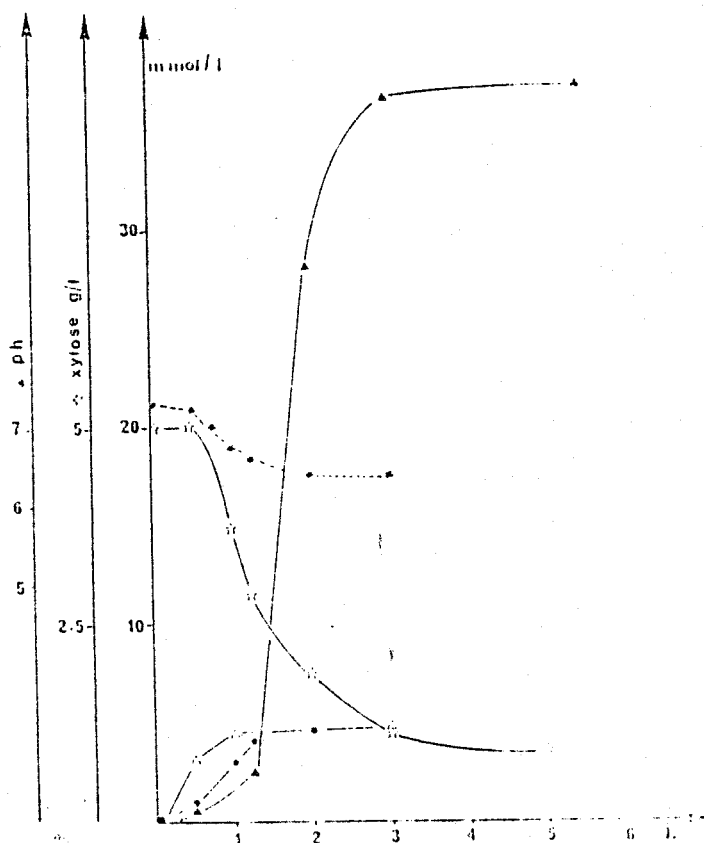


FIGURE n° 59 - CINETIQUE DE FERMENTATION DU XYLOSE PAR LA SOUCHE TX 41 -

E.- CINETIQUES ET BILANS DE FERMENTATION PAR CLOSTRIDIUM SP. TX 41

E.1.- Fermentation du glucose et du xylose:

A pH non régulé, la fermentation de ces deux substrats se fait après un temps de latence court de 6 h (figures 58 et 59). Durant les premières heures de culture, la fermentation est essentiellement de type mixte avec une production d'éthanol et d'acétate. Contrairement à la souche TC 21, la souche TX 41 n'incorpore pas de sucre, la fermentation est plus rapide et les vitesses maximales d'utilisation du glucose et du xylose par cette souche sont respectivement de 114 et 131 mg/l/h. L'apparition du lactate est rapide et se fait dès que le pH est inférieur à 6,8. Le rendement en lactate est de 1,8 moles/mole de glucose fermentée et de 1,3 moles/mole de xylose fermentée (tableau 32). De même que la souche TC 21, cet isolat ne produit que du L(-) lactate.

E.2.- Fermentation de l'amidon:

Contrairement à la souche TC 21, la souche TX 41 fermente plus complètement l'amidon à pH régulé ou non régulé, et seulement 25% se retrouvent hydrolysés sous forme de glucose non métabolisé en 125 h (figure 61). Cette fermentation se traduit par un rendement en lactate de 1,6 et 1,73 moles/mole d'équivalent glucose fermentée. Bien que cette fermentation soit plus complète, elle se fait avec une vitesse plus lente que celle de la souche TC 21.

F.- DISCUSSION - CONCLUSIONS

Dans certaines conditions de culture, les souches TC 21 et TX 41 ont un métabolisme de type homolactique sur hexoses comme sur pentoses. La fermentation lactique est réalisée par un grand nombre de microorganismes appartenant aux genres Lactobacillus, Streptococcus, Bacillus et Sporolactobacillus (DOELE, 1975; STAMER, 1979). Parmi ces genres seuls les deux derniers (Sporolactobacillus et Bacillus) sont sporulés, toutefois ils sont caractérisés par un type respiratoire anaérobie facultatif ou microaérophile (NORRIS et al., 1981 ; KITAHARA et SUZUKI, 1963). A notre connaissance, aucune bactérie anaérobie

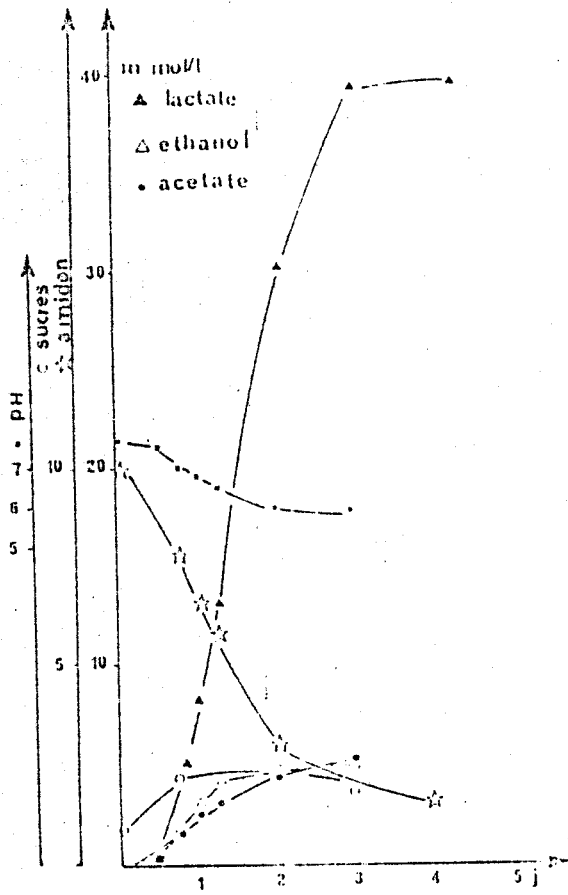


FIGURE n° 60 -

CINETIQUES DE FERMENTATION DE L'AMIDON PAR LA SOUCHE TX 41, A pH NON REGULE (fig. 60) et A pH REGULE ( fig. 61)

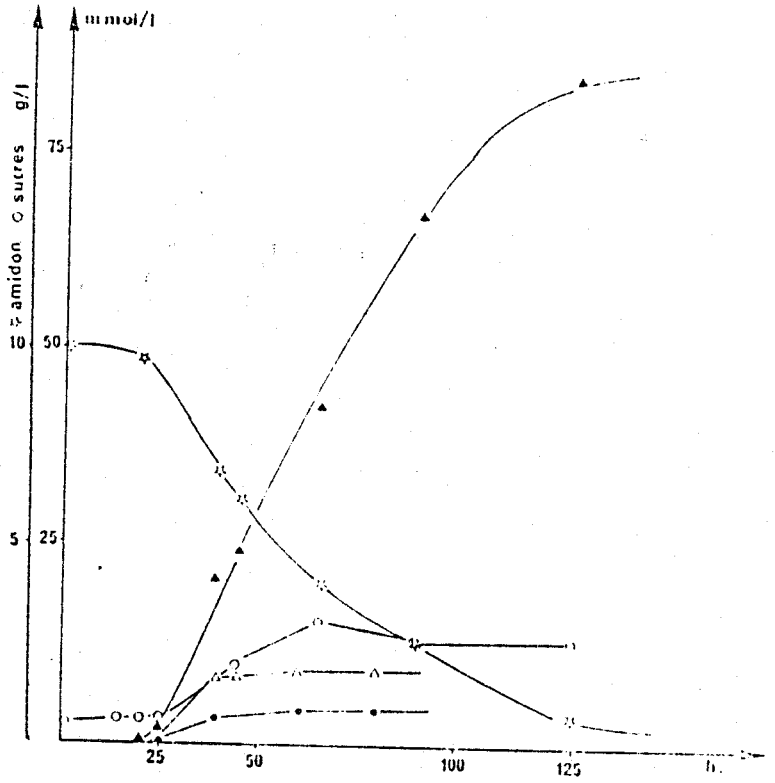


FIGURE n° 61 -

stricte du genre Clostridium n'a été décrite pour son métabolisme homolactique. Ces nouveaux isolats se distinguent alors des Clostridia thermophiles déjà décrits à la fois par leur métabolisme et leurs capacités fermentaires : C. thermocellulaseum (ENEBO, 1951; LEE et BLACKBURN, 1975) ferment le sorbitol, l'inositol et l'arabinose mais pas le mélibiose. De plus cette bactérie produit un pigment orangé et du succinate. C. thermocellum, l'espèce cellulolytique anaérobie la plus active produit aussi un pigment jaune-orangé et son spectre de fermentation est limité à la cellulose et au cellobiose (Mc BEE, 1957; NG et al., 1977). C. stercorarium est une bactérie mobile, ne fermentant pas le fructose, le mélibiose et le raffinose, mais utilisant l'arabinose et le mélézitose (MADDEN, 1983). C. thermosaccharolyticum (HOLLAUS et SLEYTR, 1972), C. thermohydrosulfuricum (WIEGEL et al., 1979) et C. thermosulfurogenes (SCHINK et ZEIKUS, 1983) ne fermentent ni la cellulose ni le xylane, et produisent de l' $H_2S$  en quantités plus ou moins importantes à partir du thiosulfate et des sulfites.

A l'exception de C. thermosaccharolyticum qui produit en plus du butyrate, l'ensemble de ces Clostridia a un métabolisme limité à la production d'acétate, d'éthanol et d' $H_2/CO_2$ , le lactate étant toujours un métabolite secondaire.

La composition en base de ces deux isolats (40,9 - 42 % G+C) est peu différente de celle de C. thermocellum et C. stercorarium (39% G+C, GOTTSCHALK et al., 1981 ; MADDEN, 1983). Par contre, la différence avec C. thermosaccharolyticum, C. thermohydrosulfuricum et C. thermosulfurogenes (29-36% G+C, GOTTSCHALK et al., 1981 ; SCHINK et ZEIKUS, 1983) est significative

Chez les souches TC 21 et TX 41, nous avons obtenu un plateau de croissance entre 60 et 55°C (souche TC 21) et entre 70 et 65°C (souche TX 41). Il est probable que ces plateaux soient dus à la synthèse de protéines différentes en fonction de la température de croissance. Cette synthèse de novo a été montrée chez C. thermohydrosulfuricum (LJUNGDHAL et al., 1981).

A une même température d'incubation et sur un même milieu de culture, ces deux souches présentent des profils protéiques électrophorétiques similaires, se différenciant nettement des autres Clostridia.

Malgré les variations morphologiques et physiologiques observées entre ces deux isolats, nous considérons qu'il s'agit d'une même espèce nouvelle, pour laquelle nous proposons le nom : Clostridium thermolacticum.

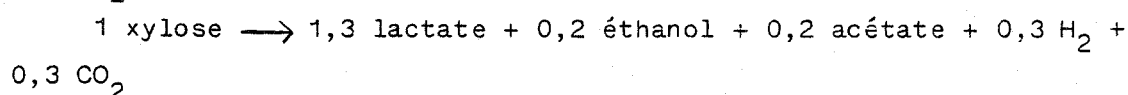
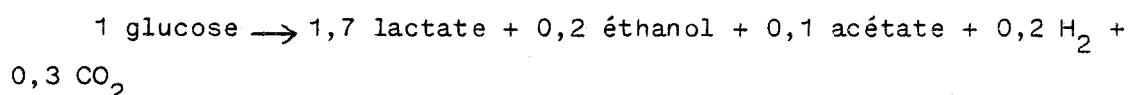
Ces souches ne produisent que du L(-) lactate. Cet isomère est retrouvé chez la plupart des bactéries thermophiles anaérobies : Thermoanaerobium brockii (LAMED et ZEIKUS, 1980), C. thermohydrosulfuricum (WIEGEL et al., 1979) et aérobies : Thermus caldophilus (TAGUCHI et al., 1982) et Bacillus stearothermophilus (NORRIS et al., 1981). Des travaux ont en effet montré que la forme L(-) de la lactate déshydrogénase était plus stable à haute température que la forme D(+), chez les Lactobacilles (HENSEL et al., 1977) ; et chez T. caldophilus, la L(-)LDH a un optimum d'activité à 80°C (TAGUCHI et al., 1982).

De même que chez de nombreuses bactéries lactiques du genre Lactobacillus et Streptococcus (DE VRIES et al., 1970; STAMER, 1979) et chez T. brockii (BEN BASSAT et al., 1981), la régulation de la lactate déshydrogénase de C. thermolacticum semble être déterminée par la concentration en substrat. En effet, sur cellulose la souche TC 21 ne produit plus de lactate mais de l'éthanol et de l'acétate. D'autre part, la production de lactate par cette souche ne se fait qu'avec une concentration en substrat supérieure à 5 g/l, à des concentrations inférieures, le métabolisme de cette souche est classique pour un Clostridium et se traduit par un bilan de fermentation de type mixte.

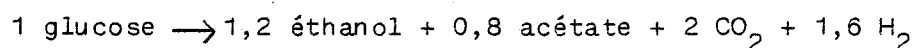
Il est probable que C. thermolacticum utilise les voies classiques des Clostridia : voie d'EMDEN-MEYERHOF-PARTNAS de dégradation des hexoses et voie de WARBURG-DICKENS de dégradation des pentoses ce qui expliquerait sa capacité à produire du lactate sur glucose comme sur xylose.

En fonction des conditions de culture, la fermentation des oses par C. thermolacticum se traduit alors par les bilans suivants:

- en substrat non limitant :



- en substrat limitant :



Contrairement à la majorité des bactéries homolactiques classiquement étudiées (THOMAS et al., 1979), nous n'avons pas observé de production de formate en substrat limitant. Dans ce cas, lorsque les conditions d'activation de la LDH ne sont pas réunies, la régénération des NADH se fait via la production d'éthanol.

Il serait alors intéressant de vérifier que cette nouvelle espèce utilise les voies de dégradation des oses classiques des Clostridia. Pour cela, certaines enzymes-clé seront à étudier, en particulier la pyruvate ferredoxine oxydoréductase, la fructose 1,6 diphosphate aldolase ainsi que la transaldolase et la transcétolase. L'activation et la régulation de ces enzymes et de la lactate déshydrogénase seront donc à étudier de façon approfondie, en fonction des conditions de culture, pour déterminer quel est le rôle du taux intracellulaire de FDP, ATP et NADH, principaux régulateurs de la LDH des bactéries classiquement étudiées.

D'autre part, l'accumulation intracellulaire de sucres par la souche TC 21, en culture sur glucose et xylose, et l'accumulation de glucose non fermenté au cours des cultures de cette souche sur amidon, sont surprenantes et distinguent bien ce biotype de la souche TX 41. Il serait alors nécessaire d'étudier les systèmes de transport de sucres et l'induction des enzymes glycolytiques chez cette espèce bactérienne. La souche TC 21 semble en effet fermenter préférentiellement les dimères (cellobiose et xylobiose) tandis que la souche TX 41 se développe plus rapidement sur les sucres simples (glucose et xylose). L'utilisation préférentielle des dimères est observée chez d'autres espèces telles C. thermocellum (NG et ZEIKUS, 1982) et R. flavefaciens (AYERS, 1958; 1959).

La dégradation de la cellulose par la souche TC 21, ou les biotypes du groupe II des thermophiles, qui présentent les mêmes particularités que cet isolat, pose d'autre part un problème nouveau. Cette souche ne fermente en effet que 15 à 30% de la cellulose (5 et 10 g/l initiaux) à pH non régulé; par contre, elle en fermente 50% (10 g/l initiaux) lorsque le pH est régulé à pH 7,0. Ces résultats montrent l'importance des conditions de culture favorisant la croissance des microorganismes. Dans ce cas, la régulation du pH permet non seulement une production de cellulases plus importante d'où une cellulolyse plus rapide, mais aussi un pourcentage final de dégradation amélioré.

3EME PARTIE

INFLUENCE DES COCULTURES SUR LES CINETIQUES  
ET LES BILANS DE FERMENTATION

-S-S-S-

L'ensemble de nos isolats présentant les caractéristiques du genre Clostridium, on pouvait supposer chez ces bactéries l'existence d'une NADH ferredoxine oxydoréductase. Cette enzyme permettrait alors de contrôler, en présence d'une bactérie hydrogénophile, la déviation des voies métaboliques des isolats vers la production d'acétate. D'une part dans le but d'augmenter les vitesses de dégradation de la cellulose, et d'autre part de lever l'inhibition de la croissance, par l'hydrogène, de certaines souches, comme c'est le cas pour la souche mésophile MC 4.

Dans un deuxième temps le couplage d'une bactérie fermentative et de C. thermocellum nous semblait intéressant pour mener à bien la fermentation des sucres libérés, à pH non régulé, par cette bactérie. Nous avons opté pour l'étude de la coculture de C. thermocellum TC 11 et C. thermolacticum TC 21, cette dernière fermentant en effet la cellulose en éthanol.

Par la suite il s'est avéré que la bactérie fermentative associée à C. thermocellum ne devait fermenter que le glucose et non pas le cellobiose. Nous avons alors étudié l'influence de la coculture de C. thermocellum avec une bactérie homoacétogène à partir d' $H_2/CO_2$  et du glucose : Acetogenium kivui.

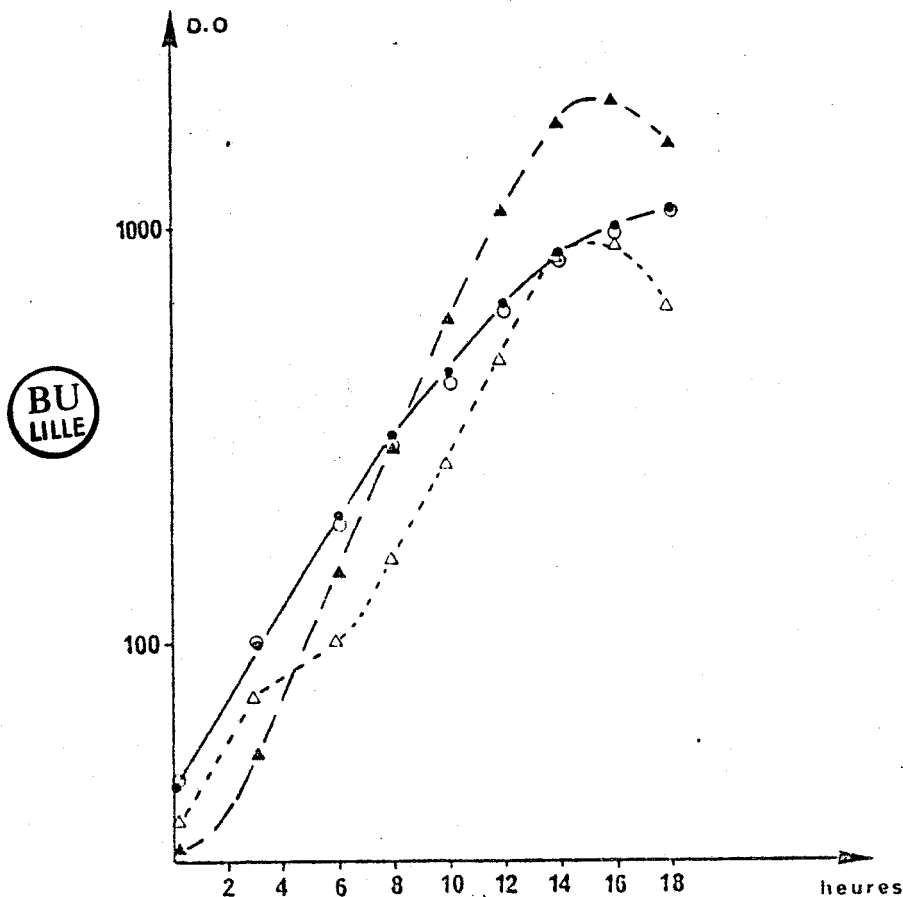


SOUCHES	PRODUITS DE LA FERMENTATION (mM)				
	acétate	éthanol	lactate	succinate	ATP (1)
MC4	16,6	6,3	13,3	0	2,9
MC4 avec W. (2) succinogenes	23,3	0,05	3,5	35,8	3,7
MC4 avec (3) Desulfovibrio sp.	14,8	4,5	6,9	0	-

**TABLEAU n° 33 - FERMENTATION DU CELLOBIOSE PAR LA SOUCHE MC4 EN MONOCULTURE ET EN COCULTURE AVEC W. SUCCINOGENES ET DESULFOVIBRIO SP. MS**

Les fermentations ont été réalisées en tubes anaérobies de 10 ml, milieu K2, 10 g/l de cellobiose, pH non régulé (pH i de 7,0)

- (1) en mole d'ATP/ mole de cellobiose fermentée
- (2) en présence de 50 mM de fumarate
- (3) en présence de 50 mM de sulfate



**FIGURE n° 62 - CROISSANCE DE LA SOUCHE MC4 EN MONOCULTURE (●) ET EN COCULTURE AVEC M. FORMICICUM (○), W. SUCCINOGENES (▲) ET DESULFOVIBRIO SP. (△) -**

les croissances ont été suivies en tubes anaérobies de 10 ml, milieu K2, pH i= 7,0

## I.- INFLUENCE DE LA COCULTURE AVEC UNE BACTERIE HYDROGENOPHILE

### A.- INFLUENCE DU TRANSFERT INTERESPECES D'HYDROGENE SUR LE METABOLISME DE LA SOUCHE MESOPHILE MC 4

La croissance de la souche mésophile MC 4 étant inhibée par de fortes pressions partielles d'hydrogène, nous avons tenté de lui associer plusieurs espèces bactériennes hydrogénophiles afin de lever cette inhibition.

Des cocultures ont ainsi été réalisées avec Methanobacterium formicicum, utilisant l' $H_2/CO_2$  pour former du méthane, Wolinella (Vibrio) succinogenes, réduisant le fumarate en succinate, et Desulfovibrio sp. MS, réduisant les sulfates en  $H_2S$ .

Les résultats sont présentés figure 62 et tableau 33. La coculture avec Methanobacterium formicicum n'a pu être établie, et au cours de nos essais nous n'avons obtenus que la croissance de la souche MC 4.

Dans le cas de la coculture avec Desulfovibrio sp. MS, en présence de sulfate (50 mM), nous avons obtenu une croissance diauxique des deux souches, et cette croissance est restée faible. La fermentation du cellobiose par cette coculture s'est accompagnée de production d' $H_2S$ , les quantités de lactate et d'éthanol formées sont plus faibles que dans le cas de la culture pure de la souche MC 4, mais la production d'acétate est restée pratiquement inchangée.

Nous n'avons obtenu une association stable que dans le cas de la coculture de la souche MC 4 avec Wolinella succinogenes. Cette dernière utilise le fumarate (50 mM) comme accepteur d'électrons et seule source de carbone. Dans ces conditions, son temps de doublement est proche de celui de la souche MC4 (3,2 h) et la figure 62 montre une croissance uniforme de ces deux bactéries. La réduction du fumarate en succinate (35,8 mM) par W. succinogenes, s'est accompagnée d'une déviation des voies métaboliques de la souche MC 4 vers la production d'acétate, avec un meilleur rendement en ATP (tableau 33)

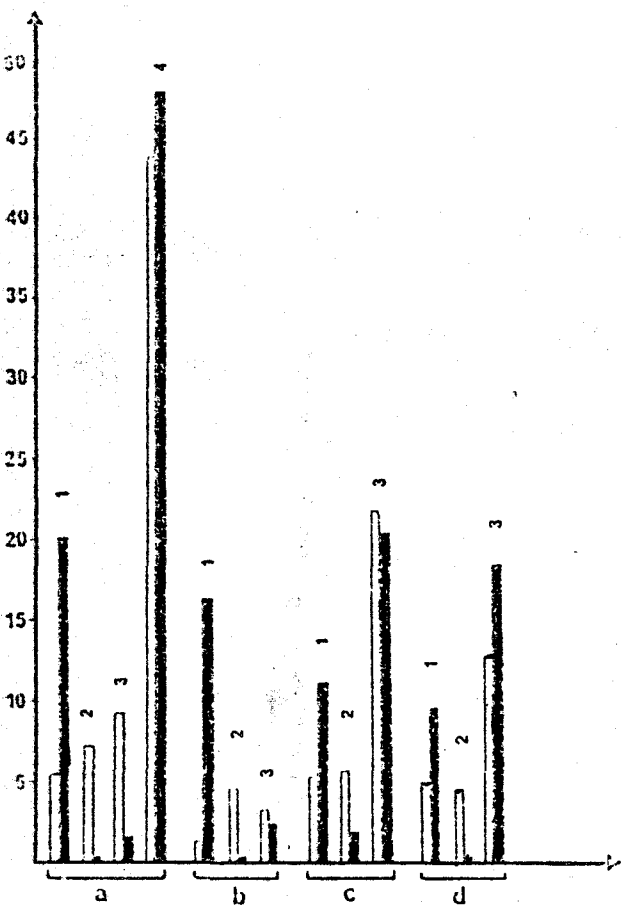


FIGURE n° 63 - INFLUENCE DE LA COCULTURE AVEC *M. THERMOAUTOTROPHICUM* souche TC5E ( ) PAR RAPPORT A LA MONOCULTURE ( ) DES SOUCHES DE *C. thermocellum* sur cellulose (a) *C. thermolacticum* TC 21 sur cellulose (b) sur xylane (c) et *C. thermolacticum* TX 41 sur xylane (d).

les produits de fermentation sont exprimés en mmol/100 mmol d'éq. glucose (ou xylose) fermentées: 1: acétate; 2: éthanol; 3: lactate 4: sucres réducteurs.

les % de fermentation obtenus sont:  
 a: monoculture 27,9% coculture 30,9%  
 b: " 12,1 " 25,1  
 c: " 38,0 " 40,5  
 d: " 27,2 " 32,0

	TC 11	+ TC5E	+ TC 21	+ TC 21 (1)
acétate	57,1	110,4	56,9	59,4
éthanol	71,4	22,5	110,2	79,5
lactate	71,4	27,6	32,9	62,2
formate	13,9	1,6	9,3	11,1
H <sub>2</sub>	00,0	0	104,5	119,0
CH <sub>4</sub>	0	54,8	0	0
CO <sub>2</sub>	14,3	76,5	157,8	138,0
sucres red.	37,8	40,5	0	0
pH final	5,95	5,95	5,67	7,4
% C retrouvé	83,1	81,6	71,2	60,3
V max (2)	108	120	82,5	
ATP calculé	2,6	3,5	2,6	



TABLEAU n° 34 - BILANS DE FERMENTATION DE LA CELLULOSE PAR *C. THERMOCELLUM* souche TC 11 EN MONOCULTURE et EN COCULTURE AVEC *M. THERMOAUTOTROPHICUM* (+ TC5E), *C. THERMOLACTICUM* (+ TC 21) à pH non régulé et à pH régulé (1) -

Les fermentations de la cellulose (10 g/l) ont été réalisées en flacons de 300 ml, milieu K2, pH i = 7,4. La fermentation à pH régulé (pH 7,4) a été réalisée en fermenteur de 2 l. Les résultats sont exprimés en mmol/100 mmol d'équivalent anhydroglucose fermentées. (2) V max en mg/l/h.

B.- INFLUENCE DE LA COCULTURE AVEC UNE BACTERIE METHANOGENE SUR LES CINETIQUES ET LES BILANS DE FERMENTATION DES SOUCHES THERMOPHILES

Les différents isolats thermophiles ont été cultivés sur cellulose, cellobiose et xylane, en absence ou présence de Methanobacterium thermoautotrophicum, souche TC 5 E, isolée au laboratoire par J.P. TOUZEL. Ces cocultures ont été réalisées sans qu'il y ait de régulation du pH (pH initial de 7,4)

En coculture avec cette bactérie méthanigène, les souches du groupe I (C. thermocellum) ne produisent pratiquement que de l'acétate (figures 63 et 64). Le rendement de conversion du substrat et la concentration finale en sucres réducteurs sont identiques dans le cas de la mono et de la coculture (tableau 34). Par contre, la vitesse de dégradation de la cellulose est plus élevée en présence de la bactérie méthanogène.

La coculture des bactéries des groupes II et III avec M. thermoautotrophicum souche TC 5 E se traduit essentiellement par une production d'acétate aux dépens de celle d'éthanol (figure 63), mais on observe un comportement de ces souches tout à fait différent selon le substrat fermenté. A la vitesse d'hydrolyse près, la souche TC 21 a un comportement identique à celui de C. thermocellum souche TC 11, sur cellulose. En effet, le temps de latence de la cellulolyse est plus court et la vitesse de dégradation de la cellulose est plus rapide en présence de la bactérie méthanigène (figure 65). Sur ce substrat le pourcentage de fermentation par la souche TC 21 est amélioré (+ 14-20%, tableau 35). Sur xylane et cellobiose, par contre, la présence d'une bactérie méthanogène n'affecte ni le rendement de conversion du substrat (environ 40%) ni la production de lactate par les bactéries des groupes II et III (figure 63).

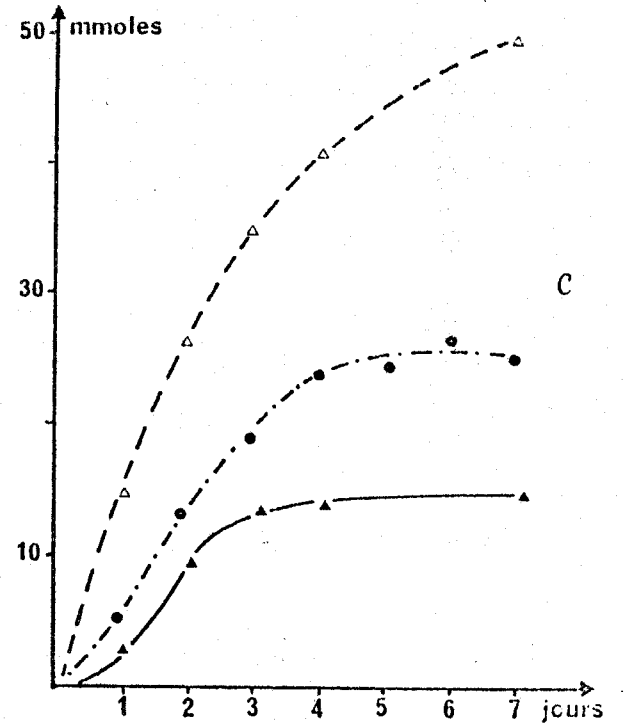
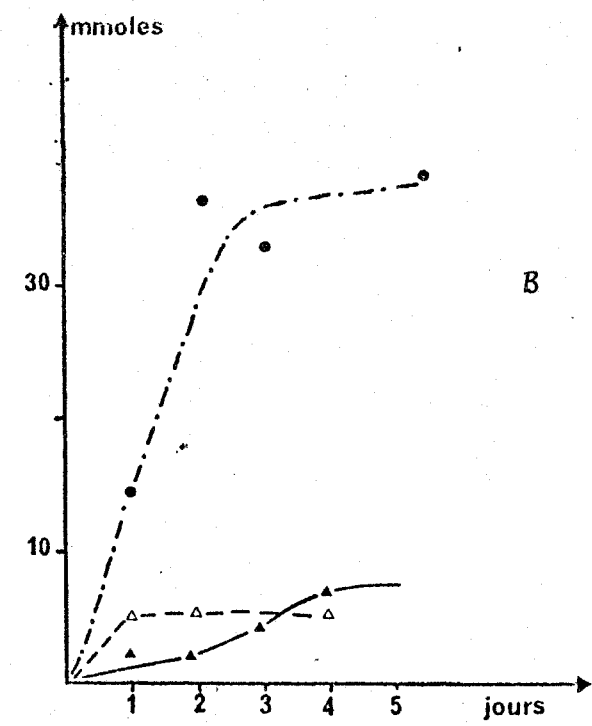
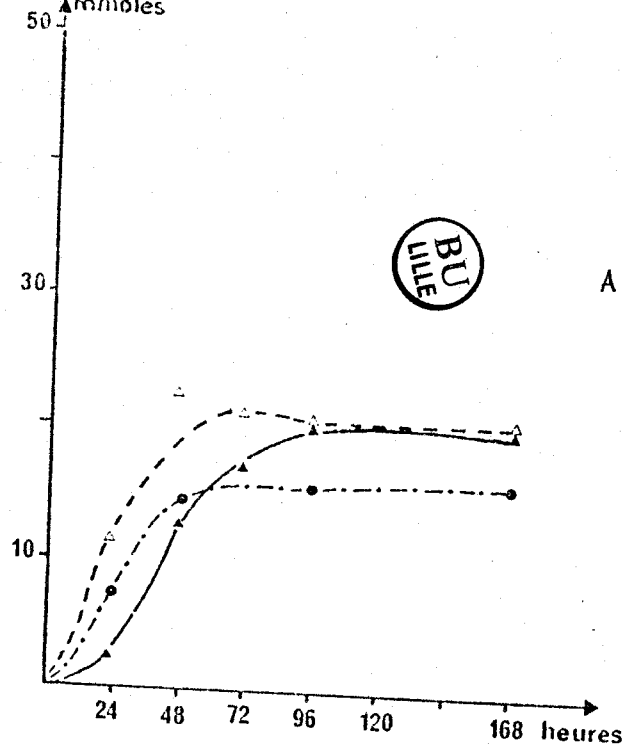
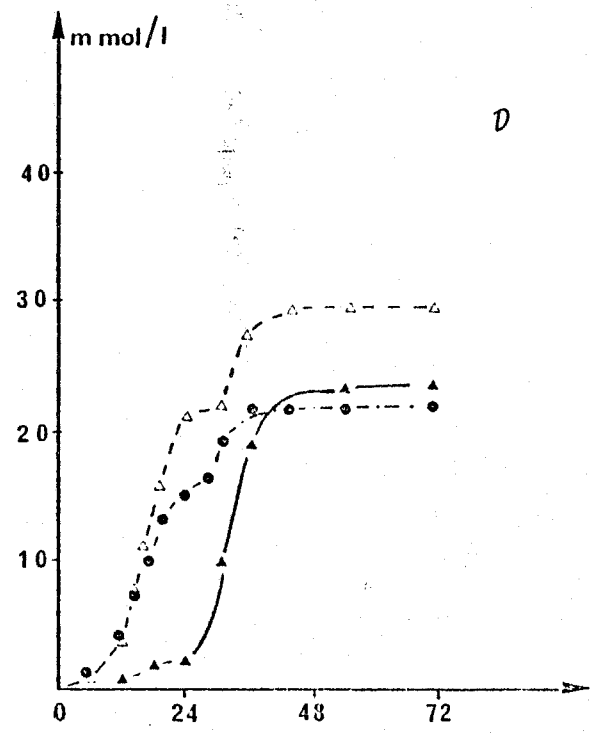


FIGURE n° 64 - CINETIQUES DE FERMENTATION DE LA CELLULOSE PAR *C. thermocellum* souche TC 11 EN CULTURE PURE (A), EN COCULTURE AVEC *M. thermoautotrophicum* souche TC5E (B), AVEC *C. thermolacticum* souche TC 21. (C) à pH non régulé et à pH régulé (D) -

les cinétiques à pH non régulé (pH i:7,4) ont été réalisées en flacons de 300 ml, milieu K2, 10 g/l de cellulose, à 65°C.  
à pH régulé (pH 7,4), la cinétique a été suivie en fermenteur de 2 l.

(•) acétate; ( $\Delta$ ) éthanol; ( $\blacktriangle$ ) lactate



## II.- INFLUENCE DE LA COCULTURE DE C. THERMOCELLUM (SOUCHE TC 11) ET DE C.THERMOLACTICUM (SOUCHE TC 21) SUR LA FERMENTATION DE LA CELLULOSE

Par rapport à la mono culture de C. thermocellum, la fermentation de la cellulose par l'association des deux souches hydrolytiques est plus lente (7 jours, figure 64 C), avec une vitesse maximale de dégradation de la cellulose de 82,5 mg/1/h, à pH non régulé. D'autre part, les produits de fermentation sont dans des rapports totalement différents (tableau 34). Le taux de production d'éthanol est multiplié par 1,5, tandis que la production d'acétate et de lactate cesse brusquement (en 4 et 3 jours respectivement). La quantité d'acétate produite par mole d'équivalent glucose fermentée ne varie pas par contre la quantité de lactate produite est diminuée de moitié. Il n'y a pas d'accumulation de sucres réducteurs dans le milieu. Cette coculture, à pH non régulé, permet donc d'améliorer le rapport éthanol/acétate, celui-ci passe en effet de 1,25 à 1,94, ainsi que le rendement de conversion du substrat.

A pH régulé (pH 7,4), nous n'avons pu obtenir d'association stable de ces deux bactéries et la figure 64 D montre, dans ce cas, une fermentation de la cellulose en deux étapes, qui s'est bloquée rapidement à 60 % de dégradation.

La production de cellulases par C. thermocellum souche TC 11 augmente progressivement pendant la phase exponentielle de croissance, et est corrélée à la dégradation de la cellulose. D'autre part, l'activité dosée sur xylane est parfaitement corrélée à celle dosée sur CMC (figures 66 et 67). Au contraire, la production d'enzyme par la souche TC 21 est beaucoup plus lente, et débute avec un temps de latence de 4 jours, la production de xylanases étant plus rapide que celle de CMC ases. Au bout de 15 jours de culture, l'activité CMC-asiatique de la souche TC21 est comparable à celle de la souche TC 11, par contre, l'activité xylanasiatique reste nettement supérieure et l'activité papier flitre est nettement inférieure (tableau 35).

La coculture de ces deux souches met en évidence un relargage immédiat de l'activité xylanasiatique, comparable à celle obtenue en fin de culture par la souche TC 21, tandis que les activités CMC-asiatiques et papier filtre apparaissent beaucoup plus lentement et restent toujours

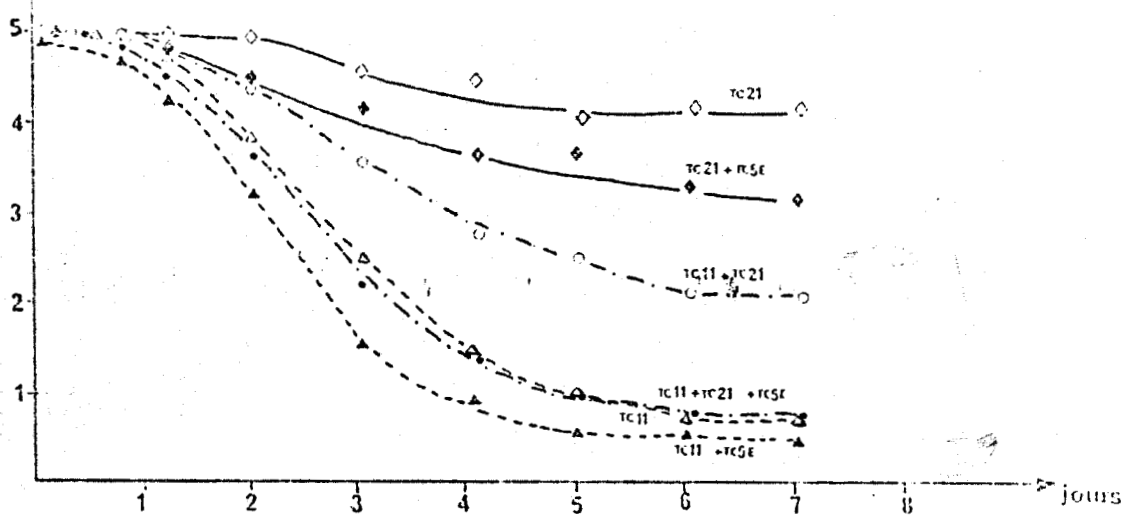


FIGURE n° 65 - CINÉTIQUES DE DÉGRADATION DE LA CELLULOSE PAR LES SOUCHES TC 11 ET TC 21 EN CULTURE PURES ET PAR LEURS COCULTURES RESPECTIVES -

( $\Delta$ ) souche TC 11; ( $\blacktriangle$ ) souches TC 11 et TC 5E; ( $\diamond$ ) souche TC 21; ( $\blacklozenge$ ) souches TC 21 et TC 5E; ( $\circ$ ) souches TC 11 et TC 21; ( $\bullet$ ) souches TC 11, TC 21 et TC 5E

la dégradation de la cellulose (5 g/l) a été suivie en flacons de 300 ml, sans régulation du pH (pH: 7,4).

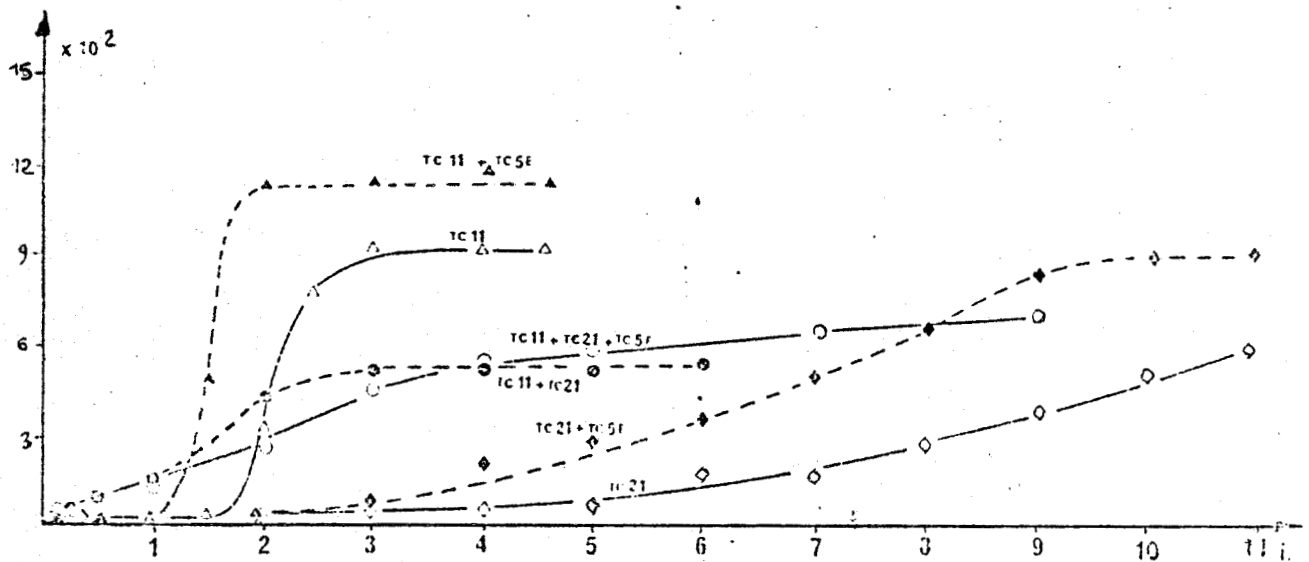


FIGURE n° 66 -

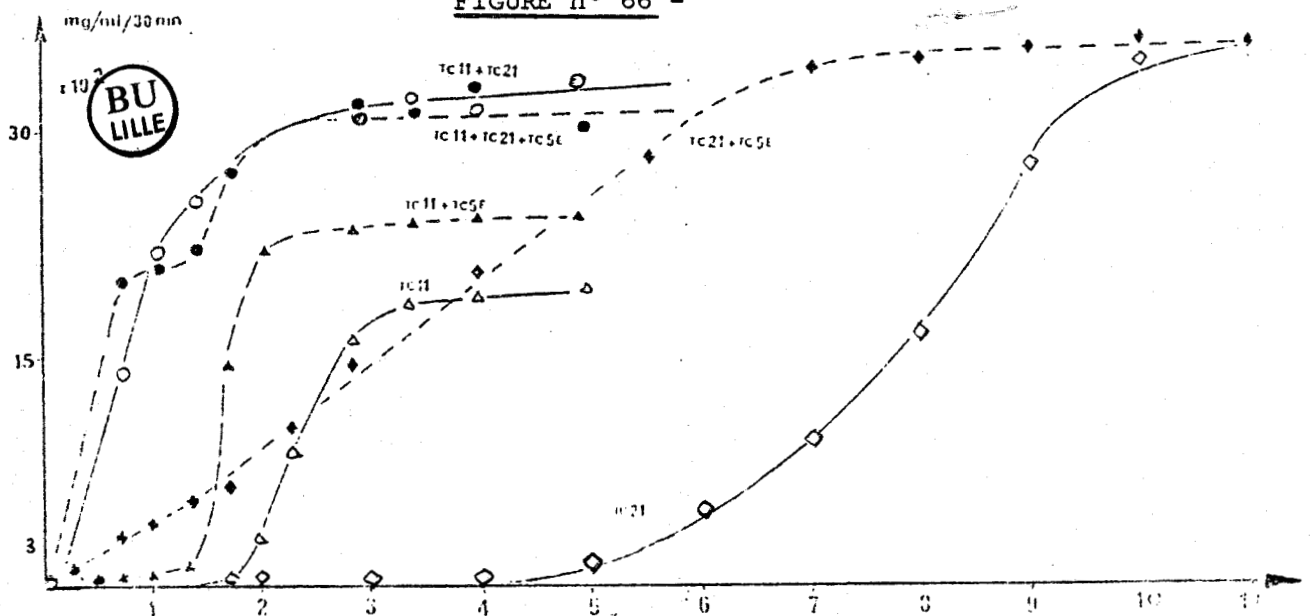


FIGURE n° 67 -

CINÉTIQUES D'APPARITION DES ACTIVITÉS CMC-ASIQUES (fig. 66) ET XYLANASIQUES (fig. 67) EXCRETÉES PAR LES DIFFÉRENTES SOUCHES ET LEURS ASSOCIATIONS -

les symboles utilisés sont les mêmes que fig. 65; les activités sont exprimées en mg d'éq. glucose (ou xylose) libérés par 1 ml pendant 30 mn.

plus faibles que celles obtenues par la culture pure de C. thermocellum. Ces résultats laissent supposer une croissance de la souche TC 21 favorisée lors de la coculture, au détriment de celle de la souche TC 11. Toutefois, dans le cas de la triculture des souches TC 11, TC 21 et TC 5E, bien que la vitesse de dégradation de la cellulose soit comparable à celle observée lors de la culture pure de C. thermocellum (figure 65), les activités CMC asiques et papier filtre restent faibles (tableau 35).

	CMCase	Xylanase	papier filtre
C. thermocellum TC 11	0,96	1,80	0,31
C. thermocellum TC 11 M.thermoautotrophicum	1,11	2,27	0,36
C. thermolacticum TC 21	0,80	3,57	0,09
C.thermolacticum TC 21 M.thermoautotrophicum	0,9	3,55	0,18
C.thermocellum TC 11 C.thermolacticum TC 21	0,5	3,42	0,15
C.thermocellum TC 11 C.thermolacticum TC 21 M.thermoautotrophicum	0,69	3,21	0,18

TABLEAU n° 35 - COMPARAISON DES ACTIVITES HYDROLYTIQUES DES SURNAGEANTS  
DE CULTURE DES DIFFERENTES SOUCHES ET DE LEURS ASSOCIATIONS -

*Les dosages ont été faits après 15 jours de culture sur cellulose (5 g/l). Les résultats sont exprimés en mg de sucres (glucose ou xylose) libérés par 1 ml de surnageant pendant 30 mn à 60°C (sur CMC et xylane) et 1 h à 60°C (sur papier filtre)*





PRODUITS (1)	C. THERMOCELLUM	+ A. KIVUI
acétate	119,5	270,0
éthanol	56,1	6,6
lactate	24,4	11,0
formate	ND	4,8
H <sub>2</sub>	239,1	12,8
CO <sub>2</sub>	175,6	10,6
sucres réducteurs	56,8	13,6
% cellulose dégradé	67,0	83,5
V max (2)	48,0	63,0
O/R index	0,99	0,99
rendement en acétate	1,19	2,70

TABLEAU n° 36 - BILAN DE FERMENTATION DE LA CELLULOSE PAR C. THERMOCELLUM EN MONOCULTURE ET EN COCULTURE AVEC A. KIVUI -

Les fermentations ont été faites en fermenteurs de 2 l. à 65°C et à pH 6,8

(1) Les résultats sont exprimés en mmoles / 100 mmoles d'équivalent anhydroglucose fermentées.

(2) V max: en mg de cellulose / l / h.

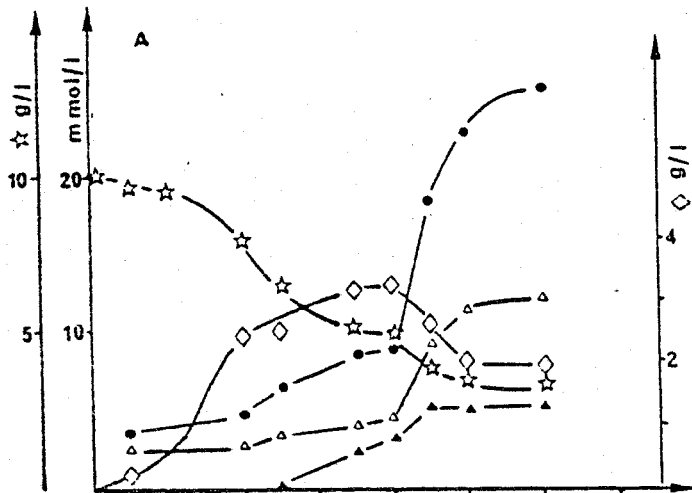


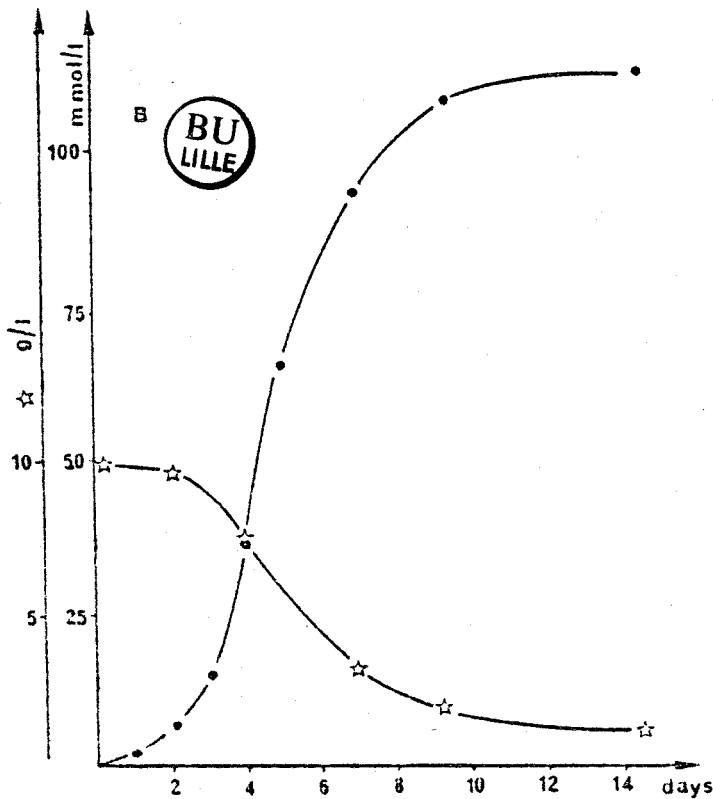
FIGURE 68 - CINETIQUES DE FERMENTATION DE LA CELLULOSE PAR C. thermocellum souche TC 11 (A) EN CULTURE PURE ET EN COCULTURE AVEC A. kivui (B)

Les fermentations ont été réalisées en fermenteurs de 2 l., à pH 6,8

- (●) acétate en mmoles/l
- (△) éthanol "
- (▲) lactate "

(◇) sucres réducteurs en g/l

(★) cellulose résiduelle en g/l



### III.- INFLUENCE DE LA COCULTURE DE C.THERMOCELLUM AVEC UNE SOUCHE HYDROGENOPHILE ET FERMENTATIVE HOMOACETOGENE

Acetogenium kivui, souche LKT-1, est homoacétogène à partir du glucose et d' $H_2/CO_2$ , mais n'utilise pas le cellobiose (LEIGH et al., 1981). Sa température de croissance optimale est de 65°C, mais son pH optimal est de 6,4. Nous avons alors opté pour l'étude de la fermentation de la cellulose par cette coculture avec un pH régulé à 6,8 de façon à permettre la croissance des deux souches.

A pH 6,8 l'hydrolyse de la cellulose par C. thermocellum souche TC 11 est environ 10 fois plus lente qu'à pH 7,4 ( $V_{max} = 48 \text{ mg/l/h}$ , figure 68 A). La fermentation de la cellulose se fait de façon diauxique et se traduit principalement par la formation d'acétate (1,19 moles/mole d'équivalent glucose). Contrairement à la fermentation à pH 7,4, durant laquelle nous n'obtenions pas d'accumulation de sucres réducteurs, à pH 6,8 les sucres s'accumulent, dès le début de la fermentation, jusqu'à 3,3 g/l. De même, contrairement à la culture à pH 7,4 lorsque C. thermocellum est cultivée en conditions défavorables pour sa croissance, le rapport acétate/éthanol est inversé. Cette plus grande quantité d'acétate formée permet en effet un meilleur gain d'ATP par mole d'équivalent glucose fermentée.

A 65°C l'association de C. thermocellum TC 11 et A. kivui LKT-1 est stable. Au cours de la fermentation de la cellulose, à pH 6,8 (figure 68 B), nous n'avons pas observé d'accumulation de sucres réducteurs en quantité importante. De faibles quantités de gaz, d'éthanol et de lactate sont formées seulement durant les premières heures de croissance. La cellulose est convertie essentiellement en acétate avec un rendement de 2,7 moles/mole d'équivalent glucose fermentée (tableau 36), proche du rendement théorique de la fermentation homoacétogène (3 moles d'acétate/mole de glucose). Cette fermentation s'accompagne d'un gain net d'ATP et la vitesse de dégradation de la cellulose est améliorée (+ 30%).

### DISCUSSION - CONCLUSIONS

Dans le cas de la coculture de la souche mésophile MC4 avec Desulfovibrio sp. MS nous avons obtenu une croissance diauxique des deux souches. Desulfovibrio sp. nécessite en effet un début de croissance de la souche MC 4 produisant de l'acétate et du CO<sub>2</sub> afin de l'incorporer comme source de carbone pour sa croissance (BADZIONG et al., 1978). Dans un deuxième temps il y a croissance des deux souches et Desulfovibrio sp. agissant comme accepteur d'hydrogène pour réduire les sulfates en H<sub>2</sub>S, il y a déviation des voies métaboliques de la souche MC 4 vers la production d'acétate. La déviation des voies métaboliques est moins nette que dans le cas de l'association avec W. succinogenes, d'une part par l'incorporation d'acétate par Desulfovibrio sp., d'autre part par l'arrêt brutal de la fermentation. Cette association n'est en effet pas stable et la lyse bactérienne intervient rapidement, probablement en raison de l'accumulation d'H<sub>2</sub>S et de la montée du pH défavorable à la souche MC 4. Desulfovibrio sp. produit en effet 2 OH<sup>-</sup> par mole d'H<sub>2</sub>S formée (BADZIONG et al., 1978).

Par contre, de même que R. albus (IANNOTI et al., 1973) la souche MC 4 en coculture avec W. succinogenes (réduisant le fumarate en succinate) ne produit pratiquement plus que de l'acétate. Cette souche possède donc une NADH ferredoxine oxydoréductase et W. succinogenes agissant comme accepteur d'H<sub>2</sub> (BRONDER et al., 1982), les NADH ne sont plus disponibles pour la synthèse du lactate et de l'éthanol, ce qui se traduit par un gain net d'ATP.

De même que pour la souche mésophile MC 4, la coculture de C. thermocellum et C. thermolacticum sur cellulose, en présence d'une bactérie hydrogénophile, se traduit par une déviation des voies métaboliques vers la production d'acétate.

En accord avec les résultats de WEIMER et ZEIKUS (1977) obtenus avec la souche LQ 8, nous n'observons pas d'amélioration du rendement de fermentation de la cellulose par C. thermocellum TC 11, sous l'influence de la coculture. Par contre, contrairement à la souche LQ 8 la souche TC 11 ne produit pratiquement plus de lactate en présence de M. thermoautotrophicum. Les faibles quantités de lactate et d'éthanol produites sont dues en fait à un début de croissance plus rapide de C. thermocellum par rapport à la bactérie méthanogène.

Dans le cas de C. cellobioparum CHUNG (1976) a montré que la bactérie méthanogène en utilisant l'hydrogène lève une inhibition de la croissance de la bactérie hydrolytique. Par contre ni la croissance de C. thermocellum (WEIMER et ZEIKUS, 1977; LAMED et ZEIKUS, 1980) ni celle de la souche TC 21 ne sont inhibées par l'hydrogène. Dans ce cas, on observe un meilleur rendement de croissance de la bactérie hydrolytique par rapport au substrat dégradé. En effet, lors de la fermentation d'une molécule d'hexose 2 ATP sont fournis par la glycolyse et 1 mole d'ATP supplémentaire est fournie lors de la production d'une mole d'acétate à partir d'une mole de pyruvate. Par contre, lors de l'excrétion de molécules plus réduites (lactate, éthanol) la cellule ne dispose que des 2 ATP fournis lors de la glycolyse.

Si les vitesses de dégradation de la cellulose sont supérieures dans le cas de la coculture de C. thermocellum TC 11 et de la souche TC 5 E, la chute du pH est aussi plus rapide et la fermentation est bloquée plus tôt : le pourcentage de dégradation finale et le pourcentage de fermentation sont pratiquement inchangés. Par contre, dans le cas de la coculture de la souche TC 21 et de la souche TC 5 E, le pourcentage de fermentation est amélioré. Il est vrai que cette fermentation étant très faible, le pH n'intervient pas comme facteur limitant.

Sur xylane la présence d'une bactérie méthanogène n'affecte ni le rendement de conversion du substrat, ni la production de lactate par les bactéries thermophiles du groupe II. Les bactéries du groupe III fermentant le xylane ont un comportement identique à celui des souches du groupe II : pas d'influence de la coculture sur la production de lactate et sur le rendement de conversion du substrat. Ces microorganismes présentent sur xylane une fermentation identique à celle sur sucres solubles c'est à dire une production de gaz couplée à la production d'acétate et d'éthanol durant les premières heures de croissance, puis la production de gaz cesse pendant la phase homolactique. La déviation des voies métaboliques intervient donc uniquement pendant les premières heures de croissance et se traduit par une production d'acétate aux dépens de celle de l'éthanol.

Lorsque le pH n'est pas régulé, l'association d'une bactérie fermentative à C. thermocellum permet d'améliorer le pourcentage de fermentation par l'utilisation des sucres libérés.

NG et al. (1981) observent des vitesses de dégradation identiques dans le cas de la monoculture de C. thermocellum et de la coculture avec C. thermohydrosulfuricum, et un pourcentage de dégradation du substrat supérieur dans le cas de la coculture. La présence de C. thermohydrosulfuricum a donc un effet favorable sur l'hydrolyse de la cellulose par C. thermocellum.

A l'inverse, la présence de la souche hydrolytique TC 21 inhibe la dégradation de la cellulose par C. thermocellum TC 11. Cette dernière hydrolyse en effet 88% de la cellulose en culture pure mais l'association de la souche TC 21 ne permet qu'une hydrolyse de 63% de la cellulose. Il est probable qu'il y ait d'une part compétition pour l'utilisation du substrat, en particulier du cellobiose libéré, ralentissant la croissance de C. thermocellum (l'ATP calculé disponible dans le cas de la coculture est le même que celui de la culture pure de C. thermocellum). En effet, C. thermocellum utilise préférentiellement le cellobiose (NG et ZEIKUS, 1982) et le transforme en glucose-1P et glucose par une cellobiose phosphorylase (ALEXANDER, 1972). Toutefois, cette compétition pour l'utilisation du substrat n'explique pas l'arrêt brutal de la fermentation et de la cellulolyse à pH réglé. Il serait alors intéressant de vérifier si la souche TC 21 synthétise un produit toxique, inhibiteur de la croissance de la souche TC 11 et de l'hydrolyse de la cellulose, au cours de sa fermentation. En effet, il est surprenant de constater un arrêt de la cellulolyse par la coculture de ces deux souches. Bien que la quantité d'hydrolases excrétées par la souche TC 11 soit plus faible, en raison de la croissance plus faible de cette bactérie, la cellulolyse aurait du se poursuivre, même lentement. Il est probable alors que certains métabolites agissent préférentiellement sur certaines fractions celluloliques en inhibant leurs activités, sans qu'il soit actuellement possible d'en déterminer le mode d'action.

D'autre part, la souche TC 21 excrète des xylanases dès le début de sa croissance, par contre l'apparition des CMC ases est très lente. L'activité CMC asique, après 15 jours de culture, est comparable à celle observée chez la souche TC 11, sans qu'il y ait pour autant reprise de la cellulolyse par la souche TC 21. Dans le cas de la triculture des souches TC 11, TC 21 et TC 5E, nous n'avons pas observé d'inhibition de la cellulolyse et la dégradation de la cellulose par cette triculture est équivalente à celle obtenue par la monoculture de C. thermocellum TC 11. Par contre, dans le cas de cette triculture, les

activités hydrolytiques dosées dans le surnageant de culture sont restées très faibles. Au vue de ces résultats, on peut douter que les activités hydrolytiques résiduelles dosées sur CMC, papier filtre ou cellulose Avicel, dans les surnageants de culture, soient réellement représentatives de la cellulolyse et de la capacité hydrolytique des espèces bactériennes.

L'association d'une bactérie fermentative ne fermentant pas le cellobiose mais utilisant le glucose, et hydrogénéophile, permet d'améliorer à la fois la vitesse de dégradation de la cellulose par C. thermocellum (meilleur rendement en ATP) et le pourcentage de fermentation, sans qu'il y ait de compétition pour l'utilisation du substrat.

La coculture de C. thermocellum TC 11 et A. kivui s'est ainsi traduite par une fermentation homoacétogène de la cellulose.

Au cours de cette fermentation sont en effet intervenues d'une part la fermentation homoacétogène d'A. kivui à partir du glucose et d' $H_2/CO_2$  produit par C. thermocellum, et d'autre part, A. kivui utilisant l'hydrogène produit, la déviation des voies métaboliques de C. thermocellum vers la production d'acétate, de même que lors de la coculture avec M. thermoautotrophicum.

Cette déviation des voies métaboliques de C. thermocellum se traduit alors par un gain d'ATP supplémentaire et la croissance bactérienne étant favorisée, la vitesse de dégradation de la cellulose est plus élevée.

D'autres auteurs ont étudié l'association de C. thermocellum et C. thermoaceticum (WANG et al., 1978). Cette dernière étant homoacétogène à partir du glucose mais n'utilisant pas l'hydrogène (ANDRESEEN et al., 1973) cette association n'a pu conduire qu'à un rendement en acétate de 0,5-0,7 mole/mole d'équivalent glucose fermentée.

Nos résultats indiquent donc qu'il est possible, par une association bactérienne appropriée, de mener une fermentation homoacétogène directe de la cellulose. D'autre part, au vu de ces résultats, il semblerait que les bactéries homoacétogènes aient un rôle significatif dans les écosystèmes thermophiles, à pH légèrement acide.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

\*\*\*\*\*

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étape préliminaire de notre travail consistait à enrichir les populations d'origine en bactéries cellulolytiques d'une part, et en bactéries hémicellulolytiques d'autre part.

Or, les dénombrements que nous avons effectués par la suite, à partir de digesteurs mésophiles et thermophiles, ont mis en évidence, dans ces deux cas, que la flore hydrolytique (cellulolytique, xylanolytique et amylolytique) faisait partie de la flore dominante de ces écosystèmes ( $10^9$  bactéries/ml). Nous devons donc poursuivre ce travail de façon à déterminer quelle est la signification écologique de nos isolats. Les techniques que nous avons utilisées, d'enrichissements et d'isolements, nous ont en effet amenés à sélectionner une flore particulièrement résistante (il s'agit essentiellement de bactéries sporulées) et peu exigeantes en facteurs de croissance. Bien que cette flore soit diversifiée, d'autres espèces bactériennes anaérobies strictes participent certainement à l'hydrolyse des polymères végétaux dans ces écosystèmes méthanigènes. En effet, à l'exception des souches de C. thermocellum, la majorité de nos isolats ne possède qu'une faible activité cellulolytique, alors que tous les enrichissements effectués ont permis une dégradation active de la cellulose. Des techniques de travail moins drastiques que celles que nous avons utilisées seraient alors nécessaires pour isoler ces espèces hydrolytiques complémentaires.

Toutefois, les souches isolées de part leur diversité et leur originalité présentent un potentiel intéressant pour l'étude physiologique, génétique et enzymatique des bactéries hydrolytiques.

Etant donné le faible rendement des cultures pures, il apparaît en effet comme essentiel de pouvoir établir des cultures d'associations bactériennes stables permettant une dégradation rapide du substrat.

La diversité de nos isolats devra nous permettre de définir de telles associations ayant les complémentarités hydrolytiques et fermentaires nécessaires à la dégradation des résidus solides des Industries Agro-Alimentaires.



Chez ces nouveaux isolats, nous devons donc étudier de façon plus détaillée :

- leurs complexes hémicellulases, amylases et cellulases en déterminant plusieurs paramètres : stabilité à la température, pH d'activité, induction et répression et spécificité de ces enzymes de façon à établir des possibilités de complémentarité hydrolytique.

- leurs physiologies, de façon à établir une complémentarité fermentative susceptible d'autre part d'orienter la dégradation des polymères végétaux vers la production d'un métabolite préférentiel.

Certaines souches isolées (C. thermolacticum) présentent un métabolisme original pour des Clostridia puisqu'elles sont homolactiques sur pentoses comme sur hexoses, dans certaines conditions de culture. Nous devons donc définir quelles sont les voies de dégradation des oses empruntées par cette espèce bactérienne, et définir le mode de régulation de la production de lactate par ces isolats. Pour cela, nous devons étudier certaines enzymes clés des Clostridia : la pyruvate ferredoxine oxydoréductase, la fructose 1,6 di-phosphate aldolase, la lactate déshydrogénase ainsi que la transcétolase et la transaldolase. D'autre part, l'étude de la régulation de ces enzymes devra se faire en fonction des conditions de culture (pH, concentration en substrat) de façon à déterminer le rôle de la concentration intracellulaire de FDP, ATP et NADH, principaux régulateurs de la lactate déshydrogénase chez les bactéries lactiques classiquement étudiées.

L'étude comparative de la dégradation de la cellulose par trois espèces bactériennes du genre Clostridium: Clostridium sp. MC4, C. thermolacticum TC 21 et C. thermocellum TC 11, montre la grande variabilité des systèmes cellulases mis en jeu par les bactéries anaérobies. Dans le cas de la souche mésophile MC 4 la cellulolyse est inhibée, et ceci d'autant plus rapidement que la croissance est plus rapide, par les métabolites de cette bactérie. Dans le cas de la souche TC 21 par contre, le pourcentage de dégradation de la cellulose est amélioré par la régulation du pH. Lorsque la croissance bactérienne est favorisée, la quantité de cellulases excrétée est plus importante et la vitesse de cellulolyse augmente, mais des différences qualitatives au niveau de la synthèse des différentes fractions cellulases ou des interactions entre les hydrolases semblent aussi intervenir dans le cas de la souche TC 21. De nombreuses questions restent donc posées au

sujet de la cellulolyse et du mode d'action des cellulases. En particulier, nous n'obtenons pas de corrélation entre les vitesses de dégradation de la cellulose et les activités hydrolytiques retrouvées dans les surnageants de culture et dosées sur CMC, papier filtre et cellulose Avicel. D'autre part, la coculture de C. thermocellum TC 11 et C. thermolacticum TC 21 a permis de mettre en évidence une inhibition ou une dénaturation du système cellulastique de C. thermocellum. Des travaux supplémentaires seraient alors nécessaires pour déterminer les paramètres conditionnant la synthèse des cellulases par les bactéries anaérobies, ainsi que leur mode d'action.

Le clonage des gènes de C. thermocellum peut faciliter l'étude de cette régulation de la synthèse de cellulases, mais aussi contribuer à produire des souches hyperproductrices. Les systèmes génétiques mis en jeu dans ce type d'étude, sont souvent basés sur l'obtention de plasmides hybrides, compatibles avec les souches étudiées et les souches réceptrices. Mais dans le cas des souches connues de C. thermocellum, aucun plasmide n'a pu être mis en évidence. En collaboration avec Mme MILLET (Institut Pasteur, PARIS), nous espérons pouvoir trouver dans notre collection un plasmide qui pourrait être la base de la constitution d'un vecteur de clonage utilisable chez tous les Clostridia thermophiles.

Les grandes différences entre les vitesses de dégradation de la cellulose par des cultures d'enrichissement et des cultures pures souligne l'importance des interactions bactériennes.

En réalisant des associations entre les différents isolats et en modifiant les conditions de culture, certains paramètres favorisant la dégradation de la cellulose ont pu être déterminés :

- la régulation du pH permet une croissance optimale de la bactérie et une déviation du métabolisme de C. thermocellum vers la formation d'éthanol aux dépens de celle du lactate. Toutefois la régulation du pH pose le problème de toxicité dû aux métabolites qui s'accumulent rapidement

- l'association avec une bactérie utilisatrice d' $H_2$  permet une utilisation énergétique optimale du substrat en raison de la synthèse exclusive d'acétate et non plus de composés réduits. La croissance des bactéries étant alors favorisée, la vitesse de dégradation de la cellulose est plus élevée

- l'association avec une bactérie fermentative, utilisatrice des sucres résultant de l'hydrolyse de la cellulose, permet un rendement de conversion optimal lorsque le pH n'est pas régulé. Toutefois, certains problèmes restent encore mal résolus. Dans le cas de la coculture de C. thermocellum TC 11 et C. thermolacticum TC 21, la vitesse de dégradation plus faible pourrait être due à des phénomènes de compétition pour le substrat ce qui se traduirait par une limitation de la vitesse de croissance de C. thermocellum, mais l'arrêt de la cellulolyse dans le cas de cette coculture met en évidence une inhibition des cellulases de C. thermocellum.

La dégradation de la cellulose peut être dirigée vers la production d'un métabolite unique par l'association d'une bactérie appropriée. Par la coculture de C. thermocellum et A. kivui homoacétogène à partir de glucose et d' $H_2/CO_2$ , nous avons ainsi obtenu une fermentation homoacétogène de la cellulose. Mais cette fermentation est lente en raison du pH de croissance d'A. kivui. Il serait alors intéressant de disposer de souches bactériennes ne fermentant pas le cellobiose et ayant une croissance à pH 7,2-7,4, proche du pH optimal de croissance de C. thermocellum.

Nos résultats indiquent que la production d'éthanol est contradictoire avec une vitesse maximale d'utilisation de la cellulose en raison du métabolisme énergétique de C. thermocellum. Cependant, si on dévie par coculture le métabolisme vers l'acétate, l'arrêt de croissance peut être dû à l'accumulation de cet acide.

Comparativement aux mésophiles, les résultats que nous avons obtenus indiquent des vitesses de dégradation de cellulose nettement supérieures et un spectre fermentaire beaucoup plus restreint (pas de propionate ni de butyrate) par l'utilisation de bactéries thermophiles.

Toutefois, ces populations ne sont pas adaptées pour la production de méthane. En effet, si dans les écosystèmes thermophiles les bactéries hydrogénophiles possèdent une température d'activité optimale identique à celle des bactéries hydrolytiques (65°C), les bactéries acétoclastes connues par contre ont une activité optimale à 55°C.

Une fermentation méthanogène thermophile en monoétape n'est donc pas intéressante pour la conversion des résidus solides. Par contre, ces résultats ont conduit à la mise en place au laboratoire, par F. ROY, d'un procédé de méthanisation en deux étapes : une liquéfaction de la biomasse à 60°C suivie d'une méthanisation à 35°C (VERRIER et al., 1983).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

\*\*\*\*\*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-\*-\*-\*--

AIT N., CREUZET N., CATTANEO J. (1979). Characterization and purification of thermostable B glucosidase from Clostridium thermocellum. Biochem. Biophys. Res. Com. 90, 537-546.

AIT N., CREUZET N., CATTANEO J. (1982). Properties of B-glucosidase purified from Clostridium thermocellum. J. of General Microbiology 128, 569-577.

ALEXANDER J.K. (1972 a). Cellobiose phosphorylase from Clostridium thermocellum. In Methods in Enzymology Vol. 28 (V. Ginsburg ed.) pp 944-948 New York Academic Press.

ALEXANDER J.K. (1972 b). Cellodextrin phosphorylase from Clostridium thermocellum. In Methods in Enzymology Vol. 28 (V. Ginsburg ed.) pp 948-953 New York Academic Press.

ALLEN A.L., ANDREOTTI R.E. (1982). Cellulose production in continuous and fed batch culture by T. reesei NCG 80. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12, 451-459.

ANDERSON R.L., WOOD W.A. (1969). Carbohydrate metabolism in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 539-577.

ANDREESEN J.R., GOTTSCHALK G., SCHLEGEL K.G. (1970). Clostridium formicoaceticum nov. sp. Isolation, description and distinction from Clostridium aceticum and Clostridium thermoaceticum. Arch. Microbiol. 72, 154-174.

ANDREESEN J.R., SCHAUPP A., NEURAUTER C., BROWN A., LJUNGDAHL L.G. (1973). Fermentation of glucose, fructose and xylose by Clostridium thermoaceticum: effect of metals on growth yield enzymes and the synthesis of acetate from CO<sub>2</sub>. J. Bacteriol. 114, 743-751.

ARANKI A., FRETER R. (1972). Use of anaerobic glove box for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. The Amer. J. Clin. Nutr. 25, 1329-1335.

ARRIETA-ESCOBAR A., BELIN J.M. (1982). Effect of polyphenolic compounds on the growth and cellulolytic activity of a strain of Trichoderma viride. Biotechnol. and Bioeng. 24, 983-989.

ASPINALL G.O. (1970). Polysaccharides. Robinson R. (ed.). Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Braunschweig.

AUNSTRUP K. (1979). Production, isolation and economics of extracellular enzymes. Appl. Biochem. Bioeng. 5, 27-69.

AVGERINOS G.C., WANG D.I.C. (1980). Direct conversion of cellulose to ethanol. Ann. Reports on Fermentation process. 4, 165-191.

AVGERINOS G.C., WANG D.I.C. (1983). Selective solvent delignification for fermentation enhancement. Biotechnol. Bioeng. 25, 67-83.

- AYERS W.A. (1958). Phosphorylation of cellobiose and glucose by Ruminococcus Flavefaciens. J. Bacteriol. 76, 515-517.
- AYERS W.A. (1959). Phosphorylation and synthesis of cellobiose by cell extracts from Ruminococcus flavefaciens. J. Biol. Chem. 234, 2819-2822.
- BADZIONG W., THAUER R.K., ZEIKUS J.G. (1978). Isolation and characterization of Desulfovibrio growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. Arch. Microbiol. 116, 41-49.
- BAILLEY R.W., GAILLARD B.D.E. (1965). Carbohydrases of the rumen ciliate Epidinium caudatum. Hydrolysis of plant hemicellulose fractions and  $\beta$  linked glucose polymeres. Biochem. J. 95, 758-766.
- BALCH W.E., WOLFE R.S. (1976). New approach to the cultivation of methanogenic bacteria 2-Mercapto-ethane-sulfonic and (HS-CoM) dependant. Growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere. Appl. Env. Microbiol. 32, 781-791.
- BALCH W.E., SCHOBERTH S., TANNER R.S., WOLFE R.S. (1977). Acetobacterium, a new genus of hydrogen oxidizing, carbon dioxide reducing anaerobic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 27, 355-361.
- BAUCHOP T., MOUNTFORT D.O. (1981). Cellulose fermentation by a Rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. Appl. Env. Microbio. 42, 1103-1110.
- BAYER E.A., KENIG R., LAMED R. (1983). Adherence of Clostridium thermocellum to the cellulose. J. Bacteriol. 156, 818-827.
- BEN-BASSAT A., LAMED R., ZEIKUS J.G. (1981). Ethanol production by thermophilic bacteria: metabolic control of end product formation in Thermoanaerobium brockii. J. Bacteriol. 146, 192-199.
- BEN-BASSAT A., ZEIKUS J.G. (1981). Thermobacteroides acetoethylicus gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic anaerobic thermophilic bacterium. Arch. Microbiol. 128, 365-370.
- BLICKSTAD E. (1983). Growth and end product formation of two psychotrophic Lactobacillus sp. and Brochothrix thermosphacta ATCC 11509 at different pH values and temperatures. Appl. Env. Microbiol. 46, 1345-1350.
- BOYER R.F., REDMOND M.A. (1983). Effect of chemical modification of cellulose on the activity of a cellulase from Aspergillus niger. Biotechnol. Bioeng. 25, 1311-1319.
- BRAUN K., GOTTSCHALK G. (1981). Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemoorganotrophic growth of Acetobacterium woodii and Clostridium aceticum. Arch. Microbiol. 128, 294-298.
- BRAUN M., GOTTSCHALK G. (1982). Acetobacterium wieringae sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3, 368-376.
- BRAUN M., MAYER F., GOTTSCHALK G. (1981). Clostridium aceticum (wieringae), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. Arch. Microbiol. 128, 288-293.

- X BRICE R.E., MORRISSON I.M. (1982). The degradation of isolated hemicelluloses and lignin hemicellulose complexes by cell free rumen hemicellulases. *Carbohydrate Res.* 101, 93-100.
- BROCK T.D. (1967). Microorganisms adapted to high temperatures. *Nature.* 214, 882-885.
- BROCK T.D. (1970). High temperature systems. *Ann. Rev. of Ecology and Syst.* 1, 191-220.
- BRONDER M., MELL H., STUPPERICH E., KROGER A. (1982). Biosynthetic pathways of Vibrio succinogenes growing with fumarate as terminal electron acceptor and sole carbon source. *Arch. Microbiol.* 131, 216-223.
- BRYANT M.P. (1959). Bacterial species of the rumen. *Bacteriol. Rev.* 23, 125-153.
- BRYANT M.P. (1972). Commentary on the Hungate technic for culture of anaerobic bacteria. *The Amer. J. Clin. Nutr.* 25, 1324-1328.
- BRYANT M.P., WOLIN E.A., WOLIN M.J., WOLFE R.S. (1976). Methanobacillus omelianskii, a synbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Microbiol.* 59, 20-31.
- CAPPENBERG R. (1975). Relationship between sulfate reducing and methane producing bacteria. *Plant. Soil.* 43, 125-139.
- CASPARI D., MACY J.M. (1983). The role of carbon dioxide in glucose metabolism of Bacteroides fragilis. *Arch. Microbiol.* 135, 16-24.
- CATLEY B.J. (1971). Role of pH and nitrogen limitation in the elaboration of the extracellular polysaccharide pullulan by Pullularia pullulans. *Appl. Microbiol.* 22, 650-654.
- CHARTIER P., DUPUY P. (1978). Matières premières d'origine végétale. Colloque de la S.F.M., Toulouse.
- CHASE T., RABINOWITZ J.C. (1968). Role of pyruvate and S adenosylmethionone in activating the pyruvate formate lyase of E. coli. *J. Bacteriol.* 96, 1065-1078.
- CHEN M. (1983). Adaptation of mesophilic anaerobic sewage fermentor populations to thermophilic temperatures. *Appl. Env. Microbiol.* 45, 1271-1276.
- CHEN L.F., GONG C.S. (1982). Enzymatic hydrolysis of cellulose pretreated with zinc chloride and hydrochloric acid. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 12, 57-65.
- CHEN M., WOLIN M.J. (1977). Influence of CH<sub>4</sub> production by Methanobacterium ruminantium on the fermentation of glucose and lactate by Selenomonas ruminantium. *Appl. Env. Microbiol.* 34, 756-759.
- CHENG K.J., HIRONAKA R., ROBERTS D.W.A., COSTERTON J.W. (1973). Cytoplasmic glycogen inclusion in cells of anaerobic Gram negative rumen bacteria. *Can. J. Microbiol.* 19, 1501-1506.

CHENG K.J., AKIN D.E., COSTERTON J.W. (1977). Rumen bacteria: interactions with particulate dietary components and response to dietary variation. Fed. Proc. 36, 193-197.

CHUNG K.T. (1976). Inhibitory effect of H<sub>2</sub> on growth of Clostridium cellobioperum. Appl. Env. Microbiol. 31, 342-348.

CLAYSENS M., LOONTIENS F.G., KERSTERS-HILDERSON H., DE BRUYNE C.K. (1970). Partial purification and properties of an Aspergillus niger  $\beta$  xylosidase. Enzymologia. 40, 177-198.

COLBERG P.G., YOUNG L.Y. (1982). Biodegradation of lignin derived molecules under anaerobic conditions. Can. J. Microbiol. 28, 886-889.

CONTAT J. (1983). Isolation, properties and postulated role of some of the xylanases from the basidiomycete Sporotrichum dimorphosporum. Carbohydrate Res. 118, 215-231.

CORNET P., TRONIK D., MILLET J., AUBERT J.P. (1983) Cloning and expression in Escherichia coli of Clostridium thermocellum genes coding for amino acids synthesis and cellulose hydrolysis. FEMS Microbiol. Lett. 16, 137-141.

COUNOTTE G.H.M., PRINS R.A. (1981). Regulation of lactate metabolism in the rumen. Veterinary Res. Communication 5, 101-115.

COONOTTE G.H.M., DE GROOT M., PRINS R.A. (1980). Kinetic parameters of lactate dehydrogenases of some rumen bacterial species: the anaerobic ciliate Isotricha prostoma and mixed rumen microorganisms. Ant. Van Leeuweshoeck. 46, 363-381.

COUPLÉ P., ALBAGNAC G. (1978). La digestion anaérobie; Application aux Industries Agro-Alimentaires. Ann. Technol. Agric. 27, 533-564.

COWLING B.E., KIRK K.T. (1976). Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion process. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 95-123.

CREUZET N., CATTANEO J., FORGET P., AIT N. (1980). Cellulase et  $\beta$  glucosidase d'une bactérie anaérobie thermophile Clostridium thermocellum. Colloque Cellulolyse Microbienne, Marseille. pp. 155-165.

CREUZET N., BERENGER J.F., FRIXON C. (1983). Characterization of exoglucanase and synergistic hydrolysis of cellulose in Clostridium stercorarium. FEMS Microbiol. Lett. (soumis à publication).

CREUZET N., FRIXON C. (1983). Purification and characterization of an endoglucanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium. Biochimie. 65, 149-156.

CROW U.L., PRITCHARD G.G. (1977). Fructose 1,6 diphosphate activated L lactate dehydrogenase from Streptococcus lactis; kinetics, properties and factors affecting activation. J. Bacteriol. 131, 82-91.

DAIN J.A., NEAL A.L., SEELEY H.W. (1956). The effect of carbon dioxide on polysaccharide production by Streptococcus bovis. J. Bacteriol. 72, 209-213.

DALE B.E., MOREIRA M.J. (1982). A freeze explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12, 31-43.



DAWES E.A., SENIOR P. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 10, 136-197.

DEHORITY B.A. (1963). Isolation and characterization of several cellulolytic bacteria from in vitro rumen fermentation. *J. Dairy. Sci.* 46, 217-222.

DEHORITY B.A. (1967). Rate of isolated hemicellulose degradation and utilisation by pure culture of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 15, 987-993.

DEHORITY B.A. (1973). Hemicellulose degradation by rumen bacteria. *Fed. Proceed.* 32, 1819-1825.

X DEHORITY B.A. (1968). Mechanism of isolated hemicellulose and xylan degradation by cellulolytic rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 16, 781-786.

DEHORITY B.A., JOHNSON R.R., CONRAD H.R. (1962) Digestibility of forage hemicellulose and pectin by rumen bacteria in vitro and the effect of lignification thereon.

DEKKER R.F.H. (1983). Bioconversion of hemicellulose: aspect of hemicellulase production by Trichoderma reesei QM 9414 and enzymatic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1127-1146.

DEKKER R.F., RICHARDS G.N. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carboh. Res. Biochem.* 32, 277-352.

DE VRIES W., STOUTHAMER A.H. (1968). Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by Bifidobacteria. *J. Bacteriol.* 96, 472-478.

DE VRIES W., KAPTEIJN M.C., VAN DER BEEK E.G., STOUTHAMER A.H. (1970). Molar growth yields and fermentation balances of Lactobacillus casei L3 in batch cultures and in continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* 63, 333-345.

DOELE W.H. (1975). *Bacterial metabolism*. New York. Academic Press.

DRAKE H.L. (1982). Demonstration of hydrogenase in extracts of the homoacetate fermenting bacterium Clostridium aceticum. *J. Bacteriol.* 150, 702-709.

DRAKE H.L. (1982). Occurrence of nickel in carbon monoxide dehydrogenase from Clostridium pasterianum and Clostridium aceticum. *J. Bacteriol.* 149, 562-566.

DRAKE H.L., HU S.I., WOOD H.G. (1981). Purification of five components from Clostridium thermoaceticum which catalyze synthesis of acetate from pyruvate and methyltetrahydrofolate. *The J. Biol. Chem.* 256, 11137-11144.

DRAKE H.L., HU S.I., WOOD H.G. (1980). Purification of carbon monoxide dehydrogenase: a nickel enzyme from Clostridium thermoaceticum. *The J. Biol. Chem.* 225, 7174-7180.

ENEBO L. (1951). On three bacteria connected with thermophilic cellulose fermentation. *Physiol. Plant.* 4, 652-666.

FAN L.T., LEE Y.H., BEARDMORE D.H. (1980). Major chemical and physical feature of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* 14, 101-117.

- X FAN L.T., LEE Y.H., GHARPURAY M.M. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biotechnol. Eng.* 23, 157-187.
- FARREL J., CAMPBELL L.L. (1969). Thermophilic bacteria and bacteriophages. *Adv. Microbiol. Physiol.* 3, 83-109.
- FERRAGUT C., LECLERC H. (1976). Etude comparative des méthodes de détermination du Tm de l'ADN bactérien. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur.* 127, 223-235.
- FONTAINE F.E., PETERSON W.H., Mc COY E., JOHNSON M.J. (1942). A new type of glucose fermentation by Clostridium thermoaceticum sp. nov. *J. Bacteriol.* 43, 701-715.
- FONTY G., GOUET P., JOUANY J.P., SENAUD J. (1983). Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumen of meroxenic lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129, 213-223.
- FONTY G., JOUANY J.P., THIVEND P., GOUET P., SENAUD J. (1983). A descriptive study of rumen digestion in meroxenic lambs according to the nature and complexity of the microflora. *Rep. Nutr. Develop.* 23, 857-873.
- FORSBERG C.W., GROLEAU D. (1982). Stability of the endo  $\beta$  1,4 glucanase from Bacteroides succinogenes. *Can. J. Microbiol.* 28, 144-148.
- FORSBERG C.W., BEVERIDGE T.J., HELLSTROM A. (1981). Cellulase and xylanase release from Bacteroides succinogenes and its importance in the rumen environment. *Appl. Env. Microbiol.* 42, 886-896.
- FUKUI, OBAYASHI, KITAHARA. (1957). Studies on the pentose metabolism by microorganisms: a new type lactic acid fermentation of pentoses by lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3, 258-268.
- FUSEE M.C., LEATHERWOOD J.M. (1972). Regulation of cellulase from Ruminococcus. *Can. J. Microbiol.* 18, 347-353.
- FRANCIS G.L., GAWTHORNE J.M., STORER G.B. (1978). Factors affecting the activity of cellulases isolated from the rumen digesta of sheep. *Appl. Env. Microbiol.* 36, 643-649.
- GAILLARD B.D.E., BAILLEY R.W., CLARKE R.T.J. (1965). The action of rumen bacteria hemicellulases on pasture plant hemicellulose fractions. *J. Agri. Sci.* 64, 449-454.
- GALLO B., TASSINARI T., SPANO L., RYU D.D.Y. (1980). Cellulose process improvement and its economics. *London-Canada. B*, 281-288.
- GARCIA-MARTINEZ D.V., SHINMYO A., MADIA A., DEMAIN A.L. (1980). Studies on cellulase production by Clostridium thermocellum. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9, 189-197.
- GASSER F., DOUDOROFF M., CONTOPOULOS R. (1970). Purification and properties of NAD dependant lactic dehydrogenases of different species of Lactobacillus. *J. Gen. Microbiol.* 62, 241-250.
- X GHOSE T.K. (1977). Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances. *Adv. Biochem. Eng.* 6, 39-76.

- X GHOSE T.K., GHOSH P. (1978). Enzymatic hydrolysis of cellulosic substances . Colloque S.F.M., Toulouse.
- GIALLO J., GAUDIN C., BELAICH J.P., PETIT-DEMANGE E., CAILLET-MANGIN F. (1983). Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic mesophilic Clostridium sp. strain H10. Appl. Env. Microbiol. 45, 843-849.
- GIESECKE D. (1968). Zur kernzahlbetmmug der anaeroben lactilyteschen bakterie gruppe in pansen. Zbl. Bakteriologie. 109, 101-106.
- GLASS T.L., BRYANT M.P., WOLIN M.J. (1977). Partial purification of ferredoxin from Ruminococcus albus and its role in pyruvate metabolism and reduction of nicotinamide adenine dinucleotide by H<sub>2</sub>. J. Bacteriol. 131, 463-472.
- GOMEZ-ALARCON R.A., O'DOWD C., LEEDLE J.A.Z., BRYANT M.P. (1982). 1,4 Naphthoquinone and other nutrient requirements of Succinivibrio dextrinosolvens. Appl. Env. Microbiol. 44, 346-350.
- GONG C.S., LADISH M.R., TSAO G.T. (1979). Biosynthesis, purification and mode of action of cellulases of Trichoderma reesei. Adv. Chem. 181.
- GORDON J., JIMINEZ M., LOONEY C.L., WANG D.I.C. (1978). Sugar accumulation during enzyme hydrolysis and fermentation of cellulose. AIChE Symposium series n° 181. 74, 91-97.
- GOTTSCHALK G. (1979). Bacterial fermentation. Dans Bacterial metabolism. Springer Verlag. New York-Heidelberg-Berlin. pp. 167-224.
- GOTTSCHALK G., ANDREESSEN J.R., HIPPE H. (1981). The genus Clostridium. Dans the Prokaryotes. Stourr M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (ed.). Springer Verlag. Vol. II. 138, 1767-1803.
- X GREGERSEN L. (1978). Rapid method for distinction of gram negative and gram positive bacteria. J. Appl. Microbiol. Biochem. 5, 123-127.
- X GROLEAU D., FORSBERG C.W. (1983). Partial characterization of the extracellular carboxymethyl cellulase activity produced by the rumen bacterium Bacteroides succinogenes. Can. J. Microbiol. 29, 504-517.
- X GROLEAU D., FORSBERG C.W. (1981). Cellulolytic activity of the rumen bacterium Bacteroides succinogenes. Can. J. Microbiol. 27, 517-530.
- GUPTA J.K., GUPTA Y.P., DAS N.B. (1973). Degradation of cellulosic material by Trichoderma viride cellulase. Agr. Biol. Chem. 37, 2657-2662.
- GUNSALUS I.C., NIVEN C.F. (1942). The effect of pH on the lactic acid fermentation. J. Biol. Chem. 145, 131-136.
- HAN Y.W., CIEGLER A. (1982). Effect of ray irradiation on sugar production from plant biomass. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12, 73-77.
- HALLIWELL G. (1979). Microbial  $\beta$  glucanases. Progress in Industrial Microbiology. 15, 1-60.
- HALLIWELL G. (1957). Cellulolysis by rumen microorganisms. J. Gen. Microbiol. 17, 153-165.

HALLIWELL G., VINCENT R. (1981). The action on cellulose and its derivatives of a purified 1,4  $\beta$  glucanase from Trichoderma koningii. *Biochem. J.* 199, 409-417.

HASHIMOTO S., MURAMATSU T., FUNATSU M. (1971). Studies on xylanases from Trichoderma viride; part I: Isolation and some properties of crystalline xylanase. *J. Biol. Chem.* 35, 501-508.

HEALY J.B., YOUNG L.Y., REINHARD M. (1980). Methanogenic decomposition of ferulic acid, a model lignin derivative. *Appl. Env. Microbiol.* 39, 436-444.

HENSEL R., MAYR V., STETTER K.O., KANDLER O. (1977). Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria. *Arch. Microbiol.* 122, 81-93.

HERRERO A.A., GOMEZ R.F. (1980). Development of ethanol tolerance in Clostridium thermocellum: effect of growth temperature. *Appl. Env. Microbiol.* 40, 571-577.

HESPELL R.B., JOSEPH R., MORTLOCK R.P. (1969). Requirement for Coenzyme A in the phosphoroclastic reaction of anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 100, 1328-1334.

HESTRIN S., SCHRAMM M. (1954). Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. *Biochem. J.* 58, 345-352.

X HILTNER P., DEHORITY B.A. (1983). Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 46, 642-648.

HOBSON P.N. (1972). Physiological characteristic of the rumen microbes and relation to diets and fermentation patterns. *Proc. Nutr. Soc.* 31, 135-139.

HOBSON P.N., SHAW B.G. (1974). The bacterial population of piggery waste anaerobic digesters. *Water Res.* 8, 507-516.

HOEBLER C., BRILLOUET J.M. (1984). Purification and properties of an endo 1,4  $\beta$  xylanase from Irpex lacteus (Polyporus tulipiferae). *Carb. Res.* 128, à paraitre.

HOLLAUS F., SLEYTR U. (1972). On the taxonomy and fine structure of some hyperthermophilic saccharolytic Clostridia. *Arch. Microbiol.* 86, 129-146.

HOPGOOD M.F., WALKER D.J. (1969). Succinic acid production by rumen bacteria: III Enzymatic studies on the formation of succinate by Ruminococcus flavefaciens. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 1413-1424.

X HOWARD B.H., JONES G., PURDOM M.R. (1960). The pentosanases of some rumen bacteria. *Biochem. J.* 74, 173-182.

HSU E.J., ORDAL Z.J. (1970). Comparative metabolism of vegetative and sporulating cultures of Clostridium thermosaccharolyticum. *J. Bacteriol.* 102, 369-376.

HU S.I., DRAKE H.L., WOOD H.G. (1982). Synthesis of acetyl coenzyme A from carbon monoxide methyltetrahydrofolate and coenzyme A by enzymes from Clostridium thermoaceticum. *J. Bacteriol.* 149, 440-448.

- X HUNGATE R.E. (1950). The anaerobic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14, 1-49.
- HUNGATE R.E. (1963). Polysaccharide storage and growth efficiency in Ruminococcus albus. *J. Bacteriol.* 86, 848-854.
- HUNGATE R.E. (1966). The rumen and its microbes. Academic Press INC. New York.
- HUNGATE R.E., STACK R.J. (1982). Phenyl propanoic acid growth factor for Ruminococcus albus. *Appl. Env. Microbiol.* 44, 79-83.
- IANNOTTI E.L., FISCHER J.R., SIEVERS D.M. (1982). Characterization of bacteria from a swine manure digester. *Appl. Env. Microbiol.* 43, 136-143.
- IANNOTTI E.L., KAFKEWITZ D., WOLIN M.J., BRYANT M.P. (1973). Glucose fermentation product of Ruminococcus grown in continuous culture with Vibrio succinogenes: Change caused by interspecies transfert of hydrogen. *J. Bacteriol.* 114, 1231-1240.
- INGLIN M., FEINBERG B.A., LOEWENBERG J.R. (1980). Partial purification and characterization of a new intracellular  $\beta$  glucosidase of Trichoderma reesei. *Biochem. J.* 185, 515-519.
- JARVIS B.D.W., HENDERSON C., ASMUNDSON R.V. (1978). The role of carbonate in the metabolism of glucose by Butyrivibrio fibrisolvens. *J. Gen. Microbiol.* 105, 287-295.
- X JERGER D.E., DOLENC D.A., CHYNOWETH D.P. (1982). Bioconversion of woody biomass as a renewable source of energy. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 12, 233-248.
- JOHNSON E.A., SAKAJOH M., HALLIWELL G., MADIA A., DEMAIN A.L. (1982). Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from Clostridium thermocellum. *Appl. Env. Microbiol.* 43, 1125-1132.
- JONAS H.A., ANDERS R.F., JAGO G.R. (1972). Factors affecting the activity of the lactate dehydrogenase of Streptococcus cremoris. *J. Bacteriol.* 111, 397-403.
- KAKENISHI S., TSUJISAKA T. (1975). On the mode of action of three xylanases produced by a strain of Aspergillus niger van Tieghem. *Agr. Biol. Chem.* 39, 2315-2323.
- KAUFMANN W., HAGETNISTER M., DIRSEN G. (1979). Adaptation to change in dietary composition level and frequency of feeding. *Dans Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants.* Ruckebusch et Thivend eds.
- KENNETH C., WILKIE B. (1979). The hemicelluloses of grasses and cereals. *Adv. Carbohydrate Chem.* 36, 215-265.
- KHAN A.W. (1980 a). Degradation of cellulose to methane by a coculture of Acetivibrio cellulolyticus and Methanosarcina barkeri. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 233-235.
- KHAN A.W. (1980 b). Cellulolytic enzyme system of Acetivibrio cellulolyticus a newly isolated anaerobe. *J. Gen. Microbiol.* 121, 499-402.

Jurasek L. 1979. Enzymatic hydrolysis of pre-treated aspen-wood - Development in industrial microbiology 20.

- KHAN A.W., MES-HARTREE M. (1981). Metabolism of acetate and hydrogen by a mixed population of anaerobes capable of converting cellulose to CH<sub>4</sub>. J. Appl. Bacteriol. 50, 283-288.
- KHAN A.W., MURRAY W.D. (1982 a). Influence of Clostridium saccharolyticum on cellulose degradation by Acetivibrio cellulolyticus. J. Appl. Bacteriol. 53, 379-383.
- KHAN A.W., MURRAY W.D. (1982 b). Isolation of a synbiotic culture of two species of bacteria capable of converting cellulose to ethanol and acetic acid. FEMS Microbiol. Lett. 13, 377-381.
- KHAN A.W., TROTTIER T.M. (1978). Effect of sulfur containing compounds on anaerobic degradation of cellulose to methane by mixed cultures obtained from swage sludge. Appl. Env. Microbiol. 35, 1027-1034.
- KHAN A.W., VAN DEN BERG R. (1981). Cellulase production by anaerobic digestion process. Biotechnol. Bioeng. Symp. 11, 325-331.
- KISIELEWSKA E. (1979). Effect of culture conditions on xylanase activity of lower fungi. Chemical Abs. 90, 361-366.
- KISNER T. (1965). Possible factors influencing the balance of different species of cellulolytic bacteria in the rumen. Dans Physiology and Digestion of the Ruminant. pp. 418-432.
- KOCK J.G., KISTNER A. (1969). Extent of solubilization of cellulose and hemicellulose of low protein teff hay by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. J. Gen. Microbiol. 55, 459-462.
- KUNDU S., GHOSE T.K., MUKHOPADHYAY S.N. (1983). Bioconversion of cellulose into ethanol by Clostridium thermocellum: product inhibitors. Biotechnol. Bioeng. 25, 1102-1126.
- LAANBROECK H.J., ABEE T., VOOGD I.L. (1982). Alcohol conversions by Desulfobulbus propionicus Lindhorst in the absence and the presence of sulfate and hydrogen. Arch. Microbiol. 133, 178-184.
- LABUDOVA I., FARKAS V. (1983). Multiple enzyme forms in the cellulase system of Trichoderma reesei during its growth on cellulose. Biochim. Biophys. Acta. 744, 135-140.
- LADISCH M.R., LIN K.W., VOLOCH M., TSAO G.T. (1983). Process consideration in the enzymatic hydrolysis of biomass. Enz. Microbiol. Technol. 5, 82-102.
- LAMED R., ZEIKUS J.G. (1980 b). Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yield of and catabolic enzyme activities in Clostridium thermocellum and Thermoanaerobium brockii. J. Bacteriol. 144, 569-578.
- LAMED R., ZEIKUS J.G. (1980 b). Glucose fermentation pathway of Thermoanaerobium brockii. J. Bacteriol. 141, 1251-1257.
- LAMED R., STETTER E., BAYER E.A. (1983). Characterization of a cellulose binding cellulase containing complex in Clostridium thermocellum. J. Bacteriol. 156, 823-836.
- LANG E., LANG H. (1972). Dosage colorimétrique spécifique de l'acide formique. Z. Anal. Chem. 260, 8-10.

- LANGWORTHY T.A., BROCK T.D., CASTENHOLZ R.W., ESSER A.F., JOHNSON E.J., OSHIMA T., TSUBOI M., ZEIKUS J.G., ZUBER H. (1979). Life at high temperatures. Strategies of life in extreme environments. Shilo M. (ed.). Berlin-Dahlen-Konferenzen. pp. 489-502.
- LATHAN M.J., WOLIN M.J. (1977). Fermentation of cellulose by Ruminococcus flavefaciens in the presence and absence of Methanobacterium ruminantium. Appl. Env. Microbiol. 34, 297-301.
- LATHAN M.J., BROOKER B.E., PETTIPHER G.L., HARRIS P.J. (1978). Adhesion of Bacteroides succinogenes in pure culture and in the presence of Ruminococcus flavefaciens to the cell walls in leaves of perennial Ryegrass (Lolium perenne). Appl. Env. Microbiol. 35, 1166-1173.
- LAUBE U.M., MARTIN S.M. (1981). Conversion of cellulose to methane and carbon dioxide by tricultures of Acetivibrio cellulolyticus, Desulfovibrio sp. and Methanosarcina barkeri. Appl. Env. Microbiol. 42, 413-420.
- LEACH P.A., BULLEN J.J., GANT T.D. (1971). Anaerobic CO<sub>2</sub> cabinet for the cultivation of strict anaerobes. Appl. Microbiol. 22, 824-827.
- LEE B.H., BLACKBURN T.H. (1975). Cellulase production by a thermophilic Clostridium species. Appl. Microbiol. 30, 346-353.
- LEE Y.H., FAN L.T. (1980). Properties and mode of action of cellulase. Adv. Biochem. Eng. 17, 101-129.
- LEE C.K., ORDAL Z.J. (1967). Regulatory effect of pyruvate on the glucose metabolism of Clostridium thermosaccharolyticum. J. Bacteriol. 94, 530-536.
- LE GALL J. (1978). Voie métaboliques anaérobies: mécanisme moléculaire du transfert interspécifique entre bactéries sulfatoréductrices et bactéries méthanogènes. Colloque de la S.F.M. Toulouse.
- LEIGH J.A., MAYER F., WOLFE R.S. (1981). Acetogenium kivui, a new thermophilic hydrogen-oxidizing acetogenic bacterium. Arch. Microbiol. 129, 275-280.
- LESCHINE S.B., CANALE-PAROLA E. (1983). Mesophilic cellulolytic Clostridia from fresh water environments. Appl. Env. Microbiol. 46, 728-737.
- LI L.H., FLORA R.M., KING K.W. (1965). Individual roles of cellulase compounds derived from Trichoderma viride. Arch. Biochem. Biophys. 111, 439-447.
- LILLEHOJ E.B., HAN Y.W. (1983). Chemical and ray modification bagasse as substrates for bioproduction of cellulases and proteins. Biotechnol. Bioeng. 25, 2077-2084.
- LJUNDAHL L.G. (1978). Physiology of thermophilic bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 19, 149-243.
- LJUNDAHL L.G., BRYANT F., CARREIRA L., SAIKI T., WIEGEL J. (1981). Some aspects of thermophilic and extreme thermophilic anaerobic microorganisms. Dans Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals. Hollaender A., Rabson R., Rogers P., San-Pietro A., Valentine R. et Wolfe R. (ed.). Plenum Press. New York-London. pp. 397-419.

LJUNDAHL L.G., PETTERSON B., ERIKSSON K.E., WIEGEL J. (1983). A yellow affinity substance involved in the cellulolytic system of Clostridium thermocellum. Cur. microbiol. 9, 195-200.

LOEWUS F.A. (1952). Improvement method for determination of carbohydrates. Anal. Chem. 24, 219-225.

LOKA-BHARATI P.A., BAULAIGUE R., MATHERON R. (1982). Degradation of cellulose by mixed cultures of fermentative bacteria and anaerobic sulfur bacteria. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3. 466-474.

LUTZEN N.W., NIELSEN M.H., OXENBOELL K.M., SCHULEIN M., STENTEBJERG-OLESEN (1983). Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 300, 283-291.

MACKIE R.I., GILCHRIST F.M.C. (1979). Changes in lactate producing and lactate utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheeps during step wise adaptation to high concentrated diets. Appl. Env. Microbiol. 38, 422-430.

MACY J., PROBST I., GOTTSCHALK G. (1975). Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine 5 triphosphate synthesis by Bacteroides fragilis grown in the presence of hemin. J. Bacteriol. 123, 436-442.

MADDEN R.H. (1983). Isolation and characterization of Clostridium stercorarium sp. nov., a cellulolytic bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 837-840.

MADDEN R.H., BRYDER M.J., POOLE N.J. (1982). Isolation and characterization of an anaerobic cellulolytic bacterium Clostridium papyrosolvans sp. nov.. Int. J. Syst. bacteriol. 32, 87-91.

MAGOT M., CARLIER J.P., POPOFF M.R. (1983). Identification of Clostridium butyricum and Clostridium beijerinckii by a gas liquid chromatography and sugar fermentation: correlation with DNA homology and electrophoretic patterns. J. Gen. Microbiol. 129, à paraître.

MANDELS M., REESE E.T. (1964). Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric. Develop. Microbiol. 5, 5-20.

MANDELS M., WEBER J. (1969). The production of cellulases. Adv. Chem. Ser. 95, 391-413.

MANDELS M., HONTZ L., NYSTRON J. (1974). Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol. Bioeng. 24, 1471-1493.

X MANDELS M., MEDEIROS J.E., ANDREOTTI R.E., BISSET F.H. (1981). Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulose culture filtrates under use conditions. Biotechnol. Bioeng. 23, 2009-2026.

Mc BEE R.H. (1950) The anaerobic thermophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Rev. 14, 51-63.

Mc CRACKEN L.D., GONG C.S. (1982). Fermentation of cellulose and hemicellulose carbohydrates by thermotolerant yeast. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12, 91-102.

X Mandels M. 1981 : cellulases - Annual reports on fermentation processes - vols



Mc DONALD D.G., BAKHSI N.N., MATHEWS J.F., ROYCHOWDHURY A., BAJPAI P., MOO-YOUNG M. (1983). Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 2067-2076.

Mc INERNEY M.J., BRYANT M.P. (1981). Anaerobic degradation of lactate by syntrophic association of Methanosarcina barkeri and Desulfovibrio species, and effect of H<sub>2</sub> on acetate degradation. *Appl. Env. Microbiol.* 41, 346-354.

MATIN A., GOTTSCHAL J.C. (1976). Influence of dilution rate on NAD(P) and NAD(P)H concentration and ratios in a Pseudomonas sp. grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 94, 333-341.

MAYER F., ELLIOT J.I., SHEROD D., LJUNGDAHL L.G. (1982). Formyltetrahydrofolate synthetase from Clostridium thermoaceticum: an electron microscopy study and specific interaction of the enzyme with ATP and ADP. *Eur. J. Biochem.* 124, 397-404.

MES-HARTREE M., SADDLER J.N. (1983). The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Lett.* 5, 531-536.

MILLER T.L. (1978). The pathway of formation of acetate and succinate from pyruvate by Bacteroides succinogenes. *Arch. Microbiol.* 117, 145-152.

MILLER T.L., JENESEL S.E. (1979). Enzymology of butyrate formation by Butyrivibrio fibrisolvens. *J. Bacteriol.* 138, 98-104.

MILLER T.L., WOLIN M.J. (1973 a). Formation of hydrogen and formate by Ruminococcus albus. *J. Bacteriol.* 116, 836-840.

MILLER T.L., WOLIN M.J. (1973 b). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivation of obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 27, 985-987.

MILLER G.L., BLUM R., GLENNON W.E., BURTON A.L. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* 2, 127-132.

MIURA H., HORIGUCHI M., OGIMOTO K., MATSUMOTO T. (1983). Nutritional interdependence among rumen bacteria during cellulose digestion in vitro. *Appl. Env. Microbiol.* 45, 726-729.

MOLETTA R., ALBAGNAC G. (1982). A gas meter for low rates gas production: Application to the methane fermentation. *Biotechnol. Lett.* 4, 319-322.

MONTENECOURT B.S., SCHAMHART D.H.J., EVELEIGH D.E. (1979). Mechanism controlling the synthesis of the Trichoderma reesei cellulase system. *Spec. Publi. Soc. Gen. Microbiol.* 3, 327-333.

MOUNTFORT D.O., ASHER R.A., BAUCHOP T. (1982). Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with Methanobrevibacter sp. strain RA and Methanosarcina barkeri. *Appl. Env. Microbiol.* 44, 128-134.

NAGASE M., MATSUO T. (1982). Interactions between amino acid degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2227-2239.

- NEILSON M.J., KELSEY R.G., SHAFIZADEH F. (1982). Enhancement of enzymatic hydrolysis by simultaneous attrition of cellulosic substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 293-304.
- NG T.K., BEN-BASSAT A., ZEIKUS J.G. (1981). Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of Clostridium thermocellum and Clostridium thermohydrosulfuricum. *Appl. Env. Microbiol.* 41, 1337-1343.
- NG T.K., WEIMER P.J., ZEIKUS J.G. (1977). Cellulolytic and physiological properties of Clostridium thermocellum. *Arch. Microbiol.* 114, 1-7.
- NG T.K., ZEIKUS J.G. (1981 a). Comparison of extracellular cellulase activities of Clostridium thermocellum LQRI and Trichoderma reesei PM 9414. *Appl. Env. Microbiol.* 42, 231-240.
- NG T.K., ZEIKUS J.G. (1981 b). Purification and characterization of an endoglucanase (1,4  $\beta$  glucan glucanohydrolase) from Clostridium thermocellum. *Biochem. J.* 199, 341-350.
- NG T.K., ZEIKUS J.G. (1982). Differential metabolism of cellobiose and glucose by Clostridium thermocellum and Clostridium thermohydrosulfuricum. *J. Bacteriol.* 150, 1391-1399.
- NISHIO N., KURISU M., NAGAI S. (1981). Thermophilic cellulose production by Talaromyces sp. in solid state cultivation. *J. Ferment. Technol.* 59, 407-410.
- NISIZAWA N., SUZUKI H., NAKAYAMA M., NISIZAWA K. (1971). Inductive formation of cellulase by sophorose in Trichoderma viride. *J. Biochem.* 70, 375-385.
- NORKANS B. (1967). Cellulose and cellulolysis. *Adv. Appl. Microbiol.* 9, 91-130.
- NORRIS J.R., BERKELEY R.C.W., LOGAN N.A. O'DONNELL A.G. (1981). The genera Bacillus and Sporolactobacillus. Dans *The Prokaryotes*. Springer-Verlag. Vol. II, pp. 1711-1742.
- X ODIER E., MONTIES B. (1983). The absence of microbial mineralization of lignin in anaerobic environments. *Appl. Env. Microbiol.* 46, 661-665.
- OHWAKI K., HUNGATE R.E. (1977). Hydrogen utilization by Clostridia in sewage sludge. *Appl. Env. Microbiol.*, 1270-1273.
- OKADA G., NISIZAWA K., SUZUKI H. (1968). Cellulase components from Trichoderma viride. *J. Biochem.* 63, 591-607.
- PACE G.W. (1980). Production of extracellular microbial polysaccharides. *Adv. Biochem. Eng.* 15, 41-70.
- PALZ W., CHARTIER R., HALL D.O. (1981). Energy from biomass. *Appl. Science Publishers.*
- PATEL G.B., BREUIL L.C. (1981). Accumulation of an iodophilic polysaccharide during growth of Acetivibrio cellulolyticus on cellobiose. *Arch. Microbiol.* 129, 265-267.
- PATEL G.B., BREUIL C., AGNEW B.J. (1982) Sulfur requirement for growth of Acetivibrio cellulolyticus. *Can. J. Microbiol.* 28, 772-777.

- PATEL G.B., KHAN A.W., AGNEW B.J., COLVIN J.R. (1980). Isolation and characterization of an anaerobic cellulolytic microorganism Acetivibrio cellulolyticus, gen. nov. sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 179-185.
- PATNI N.J., ALEXANDER J.K. (1971 a). Utilisation of glucose by Clostridium thermocellum: presence of glucokinase and other glycolytic enzymes in cell extracts. *J. Bacteriol.* 105, 220-225.
- PATNI N.J., ALEXANDER J.K. (1971 b). Catabolism of fructose and mannitol in Clostridium thermocellum: presence of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase, fructose 1-phosphate kinase, phosphoenolpyruvate:mannitol phosphotransferase and mannitol 1-phosphate dehydrogenase in cell extracts. *J. Bacteriol.* 105, 226-231.
- PEIRIS S.P., RICHARD P.D.A., DUNN N.W. (1982). Comparison of the xylanolytic and cellulolytic activities of Cellulomonas. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14, 169-173.
- PETIT-DEMANGE H., DENGON J.N., CHERRIER C., GAY R. (1974). Influence de la source carbonnée sur les activités  $\text{NAD}^+$  et  $\text{NADP}^+$  ferredoxine oxydoréductasique de Clostridium tyrobutyricum. *CR. Acad. Sci. Paris.* 278, 2707-2710.
- PETIT-DEMANGE E., FOND O., CAILLET F., PETIT-DEMANGE H., GAY R. (1983). A novel one step process for cellulose fermentation using mesophilic and glycolytic Clostridia. *Biotechnol. Lett.* 5, 119-124.
- PETRE J., LONGIN R., MILLET J. (1981). Purification and properties of an endo  $\beta$  1,4 glucanase from Clostridium thermocellum. *Biochimie.* 63, 629-639.
- PETTIPHER G.L., LATHAN M.J. (1979). production of enzymes degrading plant cell wall and fermentation of cellulose by Ruminococcus flavefaciens in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* 110, 29-38.
- PFEFFER J.T., KHANN K.A. (1976). Microbial production of methane from municipal refuse. *Biotechnol. Bioeng.* 18, 1179-1191.
- PHEIL L.G., ORDAL Z.J. (1967). Sporulation of the thermophilic anaerobes. *Appl. Microbiol.* 15, 893-898.
- PORTER D.J., SAWYER R. (1972). The automatic determination of sugars in foods-stuffs by a continuous flow technic with a redox detection. *Analyst.* 97, 569-575.
- PREVOST H. (1982). Degradação de la cellulose par Clostridium thermocellum en fonction des conditions de milieu. DEA. Dijon.
- RABINOVITCH M.L., CHERNOGLAZOV V.M., KLESOV A.A. (1983). Isoenzymes of endoglucanase in cellulase complex: different affinity for cellulose and different role in the hydrolysis of an insoluble substrate. *Biochem.* 48, 321-329.
- RAEBURN S., RABINOWITZ J.C. (1971 a). Pyruvate ferredoxine oxydoreductase; I: the pyruvate- $\text{CO}_2$  exchange reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 9-20.
- RAEBURN S., RABINOWITZ J.C. (1971 b). Pyruvate ferredoxine oxydoreductase; II: Characteristic of the forward and reverse reaction and properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 21-33.

REESE E.T., LOLA J.E., PARRISH F.W. (1969). Modified substrate and modified products as inducers of carbohydrases. *J. Bacteriol.* 100, 1151-1154.

RHO D., DESROCHERS M., JURASEK L., DRIGUEZ H., DEFAYE J. (1982). Induction of cellulases in Schizophyllum commune: thiocellobiose as a new inducer. *J. Bacteriol.* 1,

ROSENBERG S.L. (1980). Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. *Enz. Microbiol. Technol.* 2, 185-193.

RYU D.D.Y., MANDELS M. (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. *Enz. Microbiol. technol.* 2, 91-102.

RYU D.D.Y., LEE S.B., TASSINARI T., MACY C. (1982). Effect of compression milling on cellulose structure and on enzymatic hydrolysis kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1047-1067.

SADDLER J.N. (1982). Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme systems. *Enz. Microbiol. Technol.* 4, 414-418.

SADDLER J.N., HOGAN C., CHAN M.K.H., LOUIS SEIZE G. (1982 a). Ethanol fermentation of enzymatically hydrolysed pretreated wood fractions using Trichoderma cellulases, Zymomonas mobilis and Saccharomyces cerevisiae. *Can. J. Microbiol.* 28, 1311-1319.

SADDLER J.N., BROWNELL H.H., CLERMONT L.P., LEVITIN N. (1982 b). Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1389-1402.

SADDLER J.N., YU E.K.L., MES-HARTREE M., LEVITIN N., BROWNELL H.H. (1983). Utilization of enzymatically hydrolysed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels. *Appl. Env. Microbiol.* 45, 153-160.

SAKAGUCHI K., YAMAGUCHI T. (1973). Properties of extracellular acid side  $\beta$  galactosidase from Sclerotium triliparum. *J. Ferment. Technol.* 51, 750-752.

SALYERS A.A., GHERARDINI F., O'BRIEN M. (1981). Utilisation of xylan by two species of human colonic Bacteroides. *Appl. Env. Microbiol.* 41, 1065-1068.

SAMAIN E. (1982). Métabolisme des composés intermédiaires de la fermentation méthanique. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle. Université de LILLE I.

SAMAIN E., ALBAGNAC G., DUBOURGUIER H.C., TOUZEL J.P. (1982). Characterization of a new propionic acid bacterium that ferment ethanol and displays a growth factor dependant association with a gram negative homoacetogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 15, 69-74.

SCHARER J.M., MOO-YOUNG M. (1979). Methane generation by anaerobic digestion of cellulose containing wastes. *Adv. Biochem. Eng.* 11, 85-101.

SCHEIFINGER C.C., LINCHAN B., WOLIN M.J. (1975).  $H_2$  production by Selenomonas ruminantium in the absence or presence of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol.* 29, 480-483.

SCHEIFINGER C.C., WOLIN M.J. (1973). Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of Bacteroides succinogenes and Selenomonas ruminantium. *Appl. Microbiol.* 26, 789-795.

SCHINK B., PFENNIG N. (1982). Fermentation of trihydroxybenzene by Pelobacter acidigallici gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic non spore forming bacterium. Arch. Microbiol. 133, 195-201.

SCHINK B., ZEIKUS J.G. (1983). Clostridium thermosulfurogenes sp. nov., a new thermophile that produce elemental sulphur from thiosulfate. J. Gen. Microbiol. 129, 1149-1158.

X SCOTT H.W., DEHORITY B.A. (1965). Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria. J. Bacteriol. 89, 1169-1174.

SELBY K., MAITLAND C.C. (1967). The cellulase of Trichoderma viride: separation of the components involved in the solubilization of cotton. Biochem. J. 104, 716-724.

SHELEF G., KIMCHIE S., GRYNBERG H. (1980). High rate thermophilic anaerobic digestion of agricultural wastes. Biotechnol. Bioeng. Symp. 10, 341-351.

SHETH K., ALEXANDER J.K. (1967). Cellodextrin phosphorylase from Clostridium thermocellum. Biochim. Biophys. Acta. 148, 808-810.

SHINMYO A., GARCIA-MARTINEZ D.V., DEMAIN A.L. (1979) Studies on the extracellular cellulolytic enzyme complex produced by Clostridium thermocellum. J. Appl. Biochem. 1, 202-209.

SJOLANDER N.O. (1937). Studies on anaerobic bacteria: XII The fermentation products of Clostridium thermosaccharolyticum. J. Bacteriol. 34, 419-428.

SMITH W.R., YE I., HUNGATE R.E. (1973). Factors affecting cellulolysis by Ruminococcus albus. J. Bacteriol. 114, 729-737.

X SMITH M.R., ZINDER S., MAH R.A. (1980). Microbial methanogenesis from acetate. Process Biochemistry.

X SPREY, LAMBERT. (1983). Titration curves of cellulases from Trichoderma reesei demonstration of a cellulase xylanase  $\beta$  glucosidase containing complex. FEMS Microbiol. Lett. 18, 217-222.

SREENATH H.K., JOSEPH R. (1982). Purification and properties of extracellular xylan hydrolases of Streptomyces exfolia. Folia Microbiol. 27, 107-115.

STACK R.J., HUNGATE R.E., OPSAHL W.P. (1983). Phenylacetic acid stimulation of cellulose digestion by Ruminococcus albus. Appl. Env. Microbiol. 46, 539-544.

STAMER J.R. (1979). The lactic acid bacteria: microbes of diversity. Food Technol. 33, 60-65.

STERNBERG D., MANDELS G.R. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in Trichoderma reesei by sophorose. J. Bacteriol. 139, 761-769.

STERNBERG D., MANDELS G.R. (1980). Regulation of the cellulolytic system in Trichoderma reesei by sophorose: induction of cellulase and repression of  $\beta$  glucosidase. J. Bacteriol. 144, 1197-1199.

X STEWART C.S. (1977). Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. Appl. Env. Microbiol. 33, 497-502.

STEWART J.C., PARRY J.B. (1981). Factors influencing the production of cellulase by Aspergillus fumigatus. J. Gen. Microbiol. 125, 33-39.

STUTZENBERGER R. (1979). Degradation of cellulosic substances by Thermomonospora curvata. Biotechnol. Bioeng. 21, 909-913.

SU T.M., PAULAVICIUS I. (1975). Enzymatic saccharification of cellulose by thermophilic Actinomyces. Appl. Polymer. Symp. 28, 221-236.

✶ SUCHARDOVA O., VOLFOVA O.; KRUMPHANZL V., PANOS J. (1981). Physiology of growth of a mixed culture of thermophilic bacteria on cellulose under microaerophilic conditions. Biotechnol. Lett. 3, 547-550.

SUNDSTROM D.W., KLEI H.E. (1982). Uses of by product lignins from alcohol fuel processes. Biotechnol. bioeng. Symp. 12, 45-56.

TAGUCHI H., YAMASHITA M., MATSUZAWA H., OHTA T. (1982). Heat stable and fructose 1,6 diphosphate activated L lactate dehydrogenase from an extreme thermophilic bacterium. J. Biochem. 91, 1343-1348.

TANGNU S.K., BLANCH H.W., WILKE C.R. (1981). Enhanced production of cellulase, hemicellulase and  $\beta$  glucosidase by Trichoderma reesei (Rut C 30). Biotechnol. Bioeng. 23, 1837-1849.

TAYLOR C.D., Mc BRIDE B.C., WOLFE R.S., BRYANT M.P. (1974). Coenzyme M, essential for growth of a rumen strain of Methanobacterium ruminantium. J. Bacteriol. 120, 974-975.

THAUER R.K., JUNGERMANN K., DECKER K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 100-180.

THERION J.J., KISTNER A., KORNELIUS J.H. (1982). Effect of pH on growth rate of rumen amyolytic and lactilytic bacteria. Apl. Env. Microbiol. 44, 428-434.

THOMAS T.D. (1975). Tagatase 1,6 diphosphate activation of lactate dehydrogenase from Streptococcus cremoris.

THOMAS T.D., ELLWOOD M.C., LONGYEAR M.C. (1979). Change from homo to heterolactic fermentation by Streptococcus lactis resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. J. Bacteriol. 138, 109-117.

THOMPSON J. (1978). In vivo regulation of glycolysis and characterization of sugar phosphotransferase systems. J. Bacteriol. 136, 465-476.

TOERIEN D.F., HATTING W.H.J. (1969). Anaerobic digestion. I Microbiology of anaerobic digestion. Water Res. 3, 385-416.

TOUZEL J.P., ALBAGNAC G. (1983). Isolation and characterization of Methanococcus mazei strain MC3. FEMS Microbiol. Lett. 16, 241-245.

TRIVEDI L.S., RAD K.K. (1980). Cellulase induction in Aspergillus fumigatus M 126. Indian J. Exp. Biol.

TSUNODA A., NAGAKI T., SAKANO Y., KOBAYASHI T. (1977). Purification and properties of an exo 1,3 glucanase from Trichoderma viride. Agr. Biol. Chem. 41, 939-943.

- UEKI A., MIYAGAWA E., MINATO H., AZUMA K., SUTO T. (1978). Enumeration and isolation of anaerobic bacteria in sewage digester fluids. *J. Gen. Microbiol.* 24, 317-332.
- URIBELARREA J.L., PAREILLEUX A. (1981). Anaerobic digestion: microbial and biochemical aspects of volatil acid production. *Eur. J. Appl. Microbiol. biotechnol.* 12, 118-122.
- VAN GYLSWYK N.O., HOFFMAN J.P.L. (1970) Characteristics of cellulolytic Cillobacteria from the rumen of sheep fed teff hay diets. *J. Gen. Microbiol.* 60, 381-386.
- VAREL V.H., ISAACSON H.R., BRYANT M.P. (1977). Thermophilic methane production from cattle waste. *Appl. Env. Microbiol.* 33, 298-307.
- VAREL V.H., HASHIMOTO A.G., CHEN Y.R. (1980). Effect of temperature and retention time on methane production from beef cattle waste. *Appl. Env. Microbiol.* 40, 217-222.
- VERRIER D., ROY F., FLORENTZ M. (1983). Two stage anaerobic digestion of solid vegetable wastes. *Colloque Boston.*
- VILJOEN J.A., FRED E.B., PETERSON W.H. (1926). The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. *J. Agr. Sci.* 16, 1-17.
- WADDINGTON M.D., MEANY J.E. (1981). The inhibition of lactate dehydrogenase by hydrated pyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 447-453.
- WALKER D.J., HOPGOOD M.F. (1961). The hydrolysis of wheaten hay hemicelluloses by a purified enzyme from rumen microorganisms. *Austr. J. Agr. Sci.* 12, 651-660.
- WALLACE R.J. (1978). Control of lactate production by Selenomonas ruminantium: homotropic activation of lactate dehydrogenase by pyruvate. *J. Gen. Microbiol.* 107, 333-345.
- WALLACE R.J. (1980). Cytoplasmic reserve polysaccharide of Selenomonas ruminantium. *Appl. Env. Microbiol.* 39, 630-634.
- WALLNOFER P., BALDWIN R.L. (1967). Pathway of propionate formation in Bacteroides ruminicola. *J. Bacteriol.* 93, 504-505.
- WANG D.I.C. (1981). Conversion microbienne directe de la biomasse en ethanol. *Colloque de la S.F.M. Reins.*
- WANG D.I.C., COONEY C.L., WAN S.D., GORDON J., WANG G.Y. (1978). Anaerobic biomass degradation to produce sugars fuel and chemicals. *Proc. of the secon Ann. Symp. on Fuel from Biomass.* Shosten W.W. (ed.). pp. 20-22.
- WIEGEL J. (1980). Formation of ethanol by bacteria: a pledge for the use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industriel ethanol fermentation process. *Experientia.* 36, 1434-1446.
- WIEGEL J., BRAUN M., GOTTSCHALK G. (1981). Clostridium thermoautotrophicum sp. nov. a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Current Microbiol.* 5, 255-260.

WIEGEL J., LJUNGDAHL L.G. (1981). Thermoanaerobacter ethanolicus gen. nov. sp. nov., a new extreme thermophilic anaerobic bacterium. Arch. Microbiol. 128, 343-348.

WIEGEL J., LJUNGDAHL L.G., RAWSON J.R. (1979). Isolation from soil and properties of the extreme thermophile Clostridium thermohydrosulfuricum. J. Bacteriol. 193, 800-820.

WEIMER P.J., ZEIKUS J.G. (1977). Fermentation of cellulose by Clostridium thermocellum in the absence and the presence of Methanobacterium thermoautotrophicum. Appl. Env. microbiol. 33, 289-297.

⊗ WILLIAMS A.G., WITHERS S.E. (1981). Hemicellulose degrading enzymes synthesized by rumen bacteria. J. Appl. Bacteriol. 51, 375-385.

✕ WILLIAMS A.G., WITHERS S.E. (1982 a). The effect of the carbohydrate growth substrate on the glycosidase activity on hemicellulose degrading rumen bacterial isolates. J. Appl. Bacteriol. 52, 389-401.

✕ WILLIAMS A.G., WITHERS S.E. (1982 b). The production of plant cell wall polysaccharide degrading enzymes by hemicellulolytic rumen bacterial isolates grown on a range of carbohydrate substrates. J. Appl. Bacteriol. 52, 377-387.

WINTER J.U. (1980). Glucose fermentation to methane and CO<sub>2</sub> by defined mixed cultures. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C1. 293-305.<sup>2</sup>

WINTER J.U., COONEY C.L. (1980). Fermentation of cellulose and fatty acids with enrichments from sewage sludge. Eur. J. Appl. Microbiol. 11, 60-66.

WISE D.L., COONEY C.L., AUGENSTEIN D.C. (1978). Biomethanation: anaerobic fermentation of CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and CO to methane. Biotechnol. Bioeng. 20, 1153-1172.

WINTER J.U., WOLFE R.S. (1980). Methane formation from fructose by syntrophic associations of Acetobacterium woodii and different strains of methanogens. Arch. Microbiol. 124, 73-79.

WOLIN M.J. (1964). Fructose 1,6 diphosphate requirement of streptococcal lactic dehydrogenase. Science. 146, 775-776.

WOLIN M.J. (1974). Metabolic interactions among intestinal microorganisms. The Am. J. Clin. Nutr. 27, 1320-1328.

WOLIN M.J. (1975). Interactions between H<sub>2</sub>-producing and methane producing species. Dans Microbial production and utilisation of gazes. Gottingen.

WOLIN M.J. (1979). The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. Adv. Microbial Ecology. 3, 49-77.

⊗ WOLIN M.J., MILLER T.L. (1982). Interactions of microbial populations in cellulose fermentation. Fed. Proc. 42, 109-113.

WOOD W.A. (1961). Fermentation of carbohydrates and related compounds. Dans The Bacteria. Gunsalus I.C. et Stanier R.Y. (ed.). Academic Press. New York-London. Vol II, 59-149.

WOOD T.M. (1970). Cellulose and cellulolysis. World Rev. Nutr. Diet. 12, 227-265.



- WOOD T.M., Mc CRAE S.I. (1972). The purification and properties of the C1 component of Trichoderma koningii cellulase. *Biochem. J.* 128, 1183-1192.
- WOODWARD J., WISEMAN A. (1982). Fungal and other  $\beta$  D glucosidases: their properties and applications. *Enz. Microbiol. Technol.* 4, 73-79.
- WORTH H.G. (1967). The chemistry and biochemistry of pectic substances. *Chem. Rev.* 67, 465-473.
- YAMADA T., CARLSON J. (1975). Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in streptococci. *J. Bacteriol.* 124, 55-61.
- ZALEWSKA-SOBCZAK J., URBANEK H. (1981). Cellulose and xylan degrading enzymes of Fusarium avenaceum. *Arch. Microbiol.* 129, 247-250.
- ZEHNDER A.J.B., HUSER B.A., BROCK T.D., WUHRMANN K. (1980). Characterization of an acetate decarboxylating non hydrogen oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.* 124, 1-11.
- ZEIKUS J.G. (1979). Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. *Enz. Microb. Technol.* 1, 243-252.
- ZEIKUS J.G. (1980 a). Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 423-464.
- X ZEIKUS J.G. (1980 b). Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and applications. Kirk T.K. (ed.). West Palm Beach: CRC.
- ZEIKUS J.G., HENNING D.L. (1975). Methanobacterium arboriphilum sp. nov., an obligate anaerobe isolated from wet wood of living trees. *Ann. Rep. on Fermentation Proc.* 5, 263-289.
- ZUBER H. (1979). Structure and fonction of enzymes from thermophilic microorganisms. Dans *Strategies of Microbial life in extreme environments*. Shilo M. ed. Berlin-Dahlem-kanferenzen. pp. 393-415.
- ZYGMUNT M. (1983). Physiologie de Clostridium acetobutylicum et couplage cellulolyse et production de solvants. Thèse de 3<sup>o</sup> cycle. Université de Lille I.

A N N E X E

-\*-\*

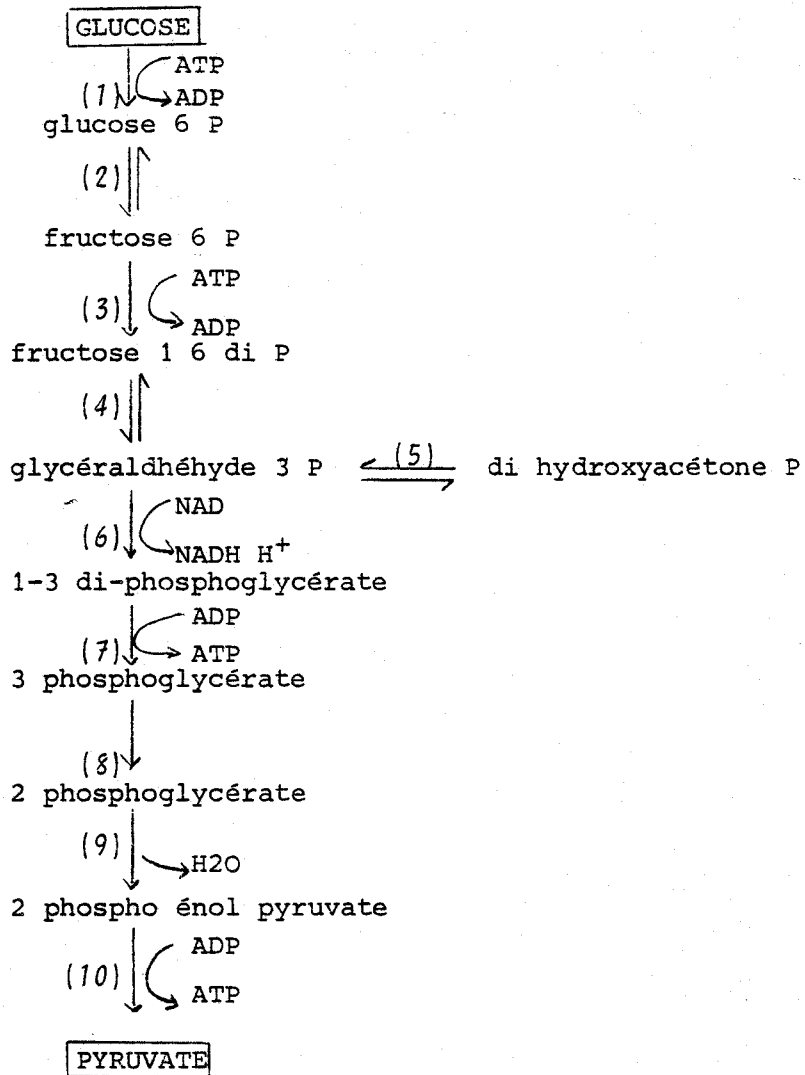


PLANCHE I - DEGRADATION DES OSES PAR LA VOIE D'EMBDEN-MEYERHOF-

-PARTNAS; (1) hexokinase; (2) phospho-glucose isomérise; (3) 6-phospho-fructokinase; (4) fructose di phosphate aldolase; (5) triose phosphate isomérise; (6) glycéraldhéhyde 3 phosphate deshydrogénase; (7) 3-phospho-glycérate kinase; (8) phospho glycérate mutase; (9) énoilase; (10) pyruvate kinase.

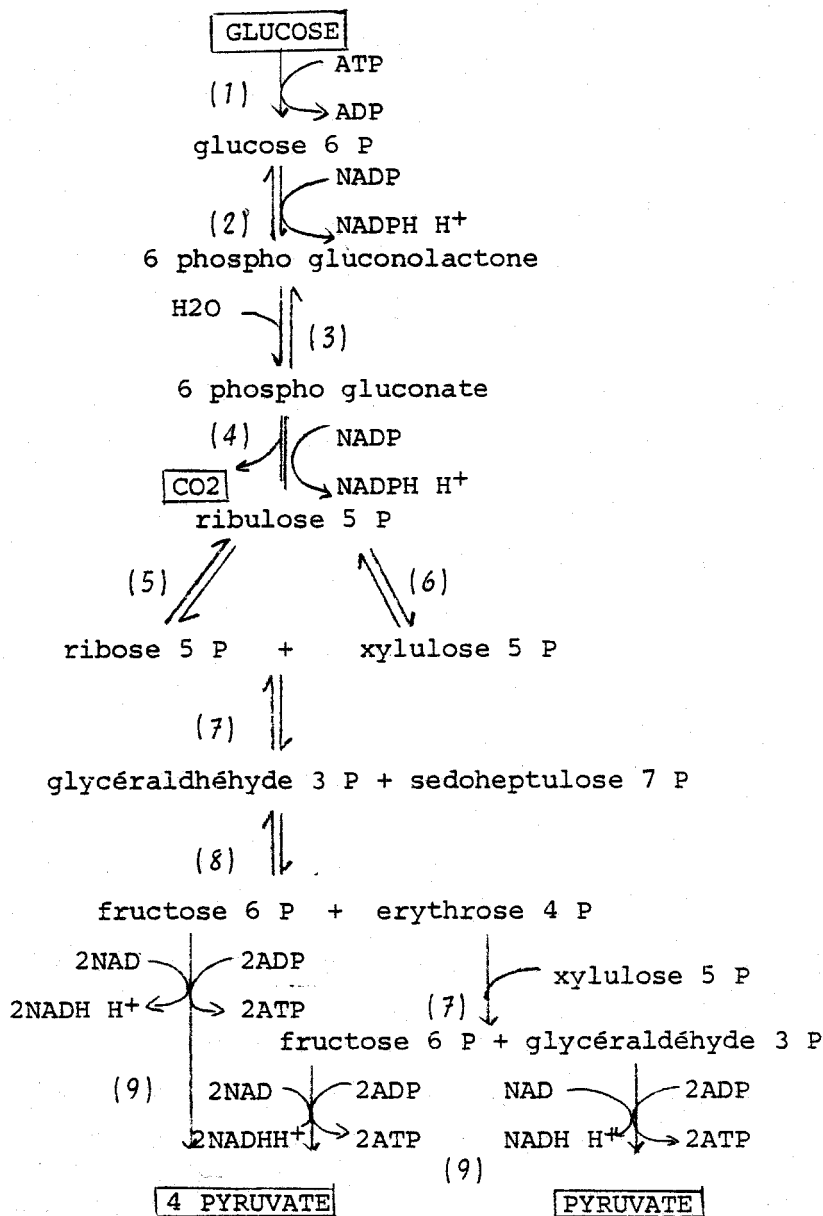


PLANCHE II - DEGRADATION DES OSES PAR LA VOIE DE WARBURG-DICKENS;

(1) hexokinase; (2) glucose 6 P deshydrogénése; (3) lactonase; (4) 6-phospho-gluconate deshydrogénése; (5) ribose phosphate isomérase; (6) ribulose-phosphate 3 épimérase; (7) transcétolase; (8) transaldolase; (9) enzymes de la voie E.M.P.

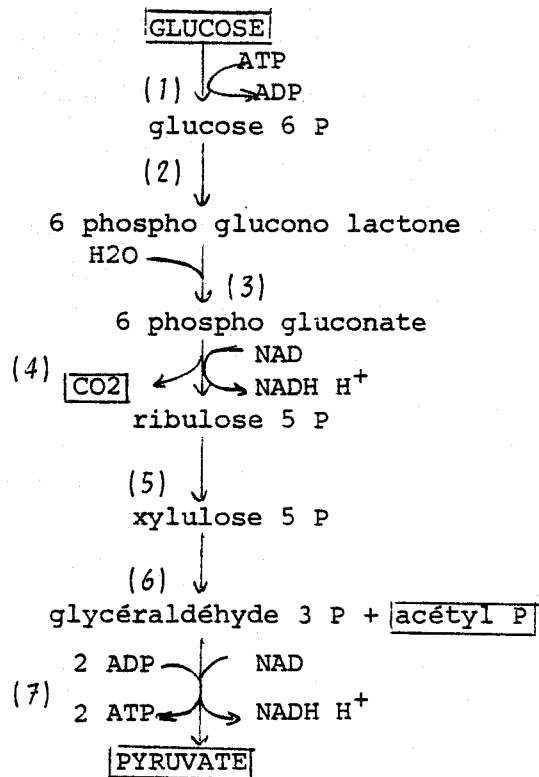


PLANCHE III - DEGRADATION DES OSES PAR LA VOIE DE LA PHOSPHOCETOLASE

- (1) hexokinase; (2) glucose 6 P deshydrogénase; (3) lactonase;  
 (4) 6 phosphogluconate deshydrogénase; (5) ribulose phosphate 3 épimérase;  
 (6) phosphocétolase; (7) enzymes de la voie EMP.

043 274 234

RESUME

Des populations d'origine variées, enrichies en cellulolytiques et en xylanolytiques présentent une fermentation acétique couplée à une production de méthane de réduction. A partir de telles cultures mixtes, 65 souches mésophiles et 83 souches thermophiles ont été isolées et groupées en fonction de leur morphologie et de leur capacité fermentaire. La majorité de ces isolats présentent les caractéristiques du genre Clostridium. Parmi eux, une souche cellulolytique mésophile (souche MC4) et deux souches thermophiles xylanolytiques et amylolytiques (souches TC 21 et TX 41) ont été étudiées en comparaison avec C. thermocellum TC 11. Les souches TC 21 et TX 41 se distinguent des Clostridia thermophiles connus et ont été définies comme une nouvelle espèce bactérienne : C. thermolacticum, en raison de leur métabolisme homolactique sur hexoses comme sur pentoses, dans certaines conditions de culture.

En réalisant des associations bactérienne entre les différents isolats et en modifiant les conditions de culture, certains paramètres favorisant la dégradation de la cellulose ont pu être déterminés: la régulation du pH, l'association avec une bactérie hydrogénophile, et l'association avec une bactérie fermentative lorsque le pH n'est pas régulé.

Une fermentation homoacétogène de la cellulose a été obtenue par l'association de C. thermocellum et A. kivui.

Mots clés: Clostridium thermocellum - Clostridium thermolacticum - Anaérobies strictes - Fermentation - Cellulolytiques - Xylanolytiques - Thermophilie - Physiologie - Acide lactique -

